

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра хімії

Кваліфікаційна робота

освітній ступінь - бакалавр

на тему: «ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ГРАФЕН ОКСИД ПОЛІМЕРНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ»

Виконала: студентка 4-го року навчання,

Спеціальності 102-Хімія

Марчук Марія Мирославівна

Науковий керівник: Коновалова В.В.

кандидат технічних наук, доцент

Рецензент Муравський С.В.

(прізвище і підпис)

Кваліфікаційна робота захищена
з оцінкою « відмінно (96) »

Секретар ЕК: Третініченко В.А.

« 10 » червне 2025 р.

Київ 2025

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1 Активні форми кисню (АФК) та інші вільні радикали	6
1.2 Антиоксидантні ефекти	8
1.3 Аскорбінова кислота як антиоксидант	10
1.4 Антибактеріальні властивості графену та його похідних	13
1.5 Антиоксидантні властивості графен оксиду	16
1.6 Графен-полімерні нанокompозити для доставки ліків	17
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	19
2.1 Матеріали та реактиви.....	19
2.2 Методи дослідження.....	20
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	27
3.1 Аналіз синтезованих структур графен оксид полімерних нанокompозитів	27
3.2 DLS аналіз синтезованих графен оксид полімерних нанокompозитів ...	29
3.3 Морфологія синтезованих графен оксид полімерних нанокompозитів	33
3.4 Оцінка антиоксидантних властивостей графен оксид полімерних нанокompозитів	37
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46

Вступ

Оксидативний стрес - це дисбаланс між вільними радикалами, що продукуються оксидантами та антиоксидантами, що призводить до порушення окислювально-відновних процесів та пошкодження на молекулярному рівні [1]. На це впливають як внутрішні, так і зовнішні фактори, такі як: стан здоров'я, вік людини, УФ-випромінювання, тютюновий дим, забруднення повітря або дієта. Надмірне утворення активних форм кисню (АФК) в результаті порушення природного функціонування організму є оксидативним стресом.

Накопичення АФК призводить до розвитку захворювань та зниження функціональності біологічних структур, саме тому розробка ліків для ефективного зниження АФК є актуальною проблемою. Антиоксиданти - це система захисту організму від пошкодження АФК, які зазвичай утворюються в організмі в результаті різних фізіологічних процесів. Антиоксиданти усувають проміжні продукти вільнорадикального окислення, як інгібітори, окислюючись самі, навіть у дуже малих концентраціях. Для запобігання реакцій окислення, антиоксиданти активують фізіологічні механізми для захисту організму від небезпечних ланцюгових реакцій [2].

В останні десятиліття сучасні дослідження спрямовані на розробку ефективних і прогресивних засобів доставки лікарських засобів, в тому числі з використанням наночастинок (НЧ). Полімери є універсальними хімічними сполуками, тому полімерні НЧ можуть бути використані в наномедицині, доставці ліків та діагностичних методах. Унікальною особливістю полімеру є те, що він може включати різні домени, кожен з яких має різну функціональність, але вони впорядковано розташовані в структурі полімеру

[3]. Це відкриває нові можливості для цікавих інновацій та розробки багатофункціональних і вдосконалених наноматеріалів.

Останнім часом графен оксид (GO) привертає все більшу увагу дослідників завдяки своїм чудовим електронним, оптичним та тепловим властивостям. Завдяки своїй надтонкій структурі та насиченим кисневмісним дефектам, GO є ідеальним матеріалом для створення носіїв для лікарських препаратів. Таким чином, унікальні властивості GO відкривають перспективи для вирішення низки проблем у сфері доставки лікарських засобів та розробки нових препаратів у фармацевтиці та медицині.

Актуальність роботи: розробка біосумісних, нанорозмірних прототипів лікарських препаратів із високою здатністю вловлювати вільні радикали на клітинному рівні для посилення антиоксидатного опору організму при розвитку хвороб, спричинених оксисним стресом (серцево-судинні захворювання, нейродегенеративні, імунологічні, діабет тощо).

Мета роботи: синтезувати полімерні наноккомпозити на основі графен оксиду (GO) та полівінілпіролідону (PVP) та визначити антиоксидантні властивості синтезованих матеріалів.

Завдання:

1. Проаналізувати основні властивості вихідного графен оксиду: структуру, розмір частинок, властивості та застосування.
2. Визначити адсорбційну ємність графен оксиду щодо полівінілпіролідону та синтезувати наступні наноккомпозити:
 - графен оксид - PVP
 - графен оксид - PVP -L-аскорбінова кислота
 - графен оксид - PVP - нікотинова кислота
3. Підтвердити синтезовані структури методом ІЧ спектроскопії

4. Визначити розміри синтезованих нанокompозитів та їх стабільність при різних рН методом динамічного світлорозсіювання (DLS).
5. Дослідити антиоксидантні властивості отриманих графен оксид полімерних нанокompозитів.
6. Дослідити морфологічні властивості синтезованих матеріалів методом SEM, AFM.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Активні форми кисню (АФК) та інші вільні радикали

Кисень - високоактивний неметал і є сильним окисником, який легко утворює оксиди з більшістю елементів, а також з іншими сполуками. В атмосфері він існує в основному стані у вигляді стабільного триплетного бірадикалу ($^3\text{O}_2$) і піддається поетапному відновленню [4]. Хоча молекулярний кисень є відносно стабільним, його відновлення призводить до утворення активних форм кисню (АФК). АФК - це молекули на основі кисню та вільні радикали з високою реакційною здатністю. Прикладами АФК є: пероксиди (H_2O_2), супероксид ($\cdot\text{O}_2^-$), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), гідроксильний іон (OH^-) і синглетний кисень ($^1\text{O}_2$) (рис. 1.1). При високих концентраціях всі форми АФК стають токсичними і можуть взаємодіяти з різними органічними молекулами, такими як нуклеїнові кислоти та ліпіди [5]. Як наслідок, окисний стрес виникає, коли з'являється дисбаланс між утворенням та виведенням АФК [6].

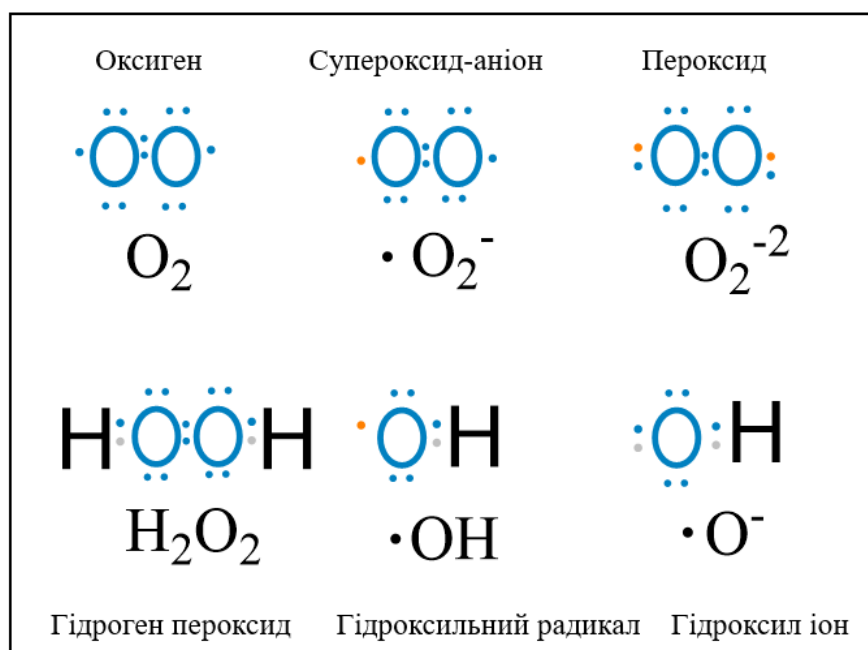
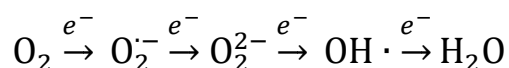


Рис. 1.1 Структури активних форм кисню (АФК)

Приблизно 1-2% від загального обсягу O_2 , що використовується або споживається метаболізмом, перетворюється на АФК [7]. У цьому стані молекулярний кисень містить два неспарені електрони з паралельними спінами на окремих антизв'язувальних орбіталях, що обмежує його реакційну здатність. Як наслідок, молекулярний кисень може приймати спарені електрони від донора електронів.

Кисень відіграє важливу роль в окисно-відновних та ферментативних процесах в живих організмах. Його здатність передавати електрони між атомами робить кисень надзвичайно важливим для аеробного життя і клітинного метаболізму, оскільки виступає кінцевим акцептором електронів у ланцюзі їх транспорту, зрештою генеруючи енергію у формі аденозинтрифосфату (АТФ) [8]. Однак можуть виникнути ускладнення, якщо електронні зв'язки роз'єднуються, що призводить до утворення вільних радикалів.

Вільний радикал - це сполука, здатна існувати незалежно і характеризується наявністю одного або більше неспарених електронів. Ці вільні радикали є дуже нестабільними молекулами, що утворюються як природний результат метаболічної активності в мітохондріях. Ця нестабільність виникає через нездатність досягти октетної конфігурації. Процес послідовного відновлення молекулярного кисню до води відбувається в чотири одновалентні етапи:



У цьому електронному потоці O_2 може відновлюватися різними шляхами, включаючи генерацію O^{2-} , утворення 1O_2 або виробництво H_2O_2 .

Більшість кисню, що використовується організмом, повністю відновлюється до води за один крок на кінцевому цитохромі мітохондріального ланцюга транспорту кисню. Однак, за певних умов, відновлений кисень може проходити через проміжні форми, перш ніж в кінцевому підсумку утворюється H_2O_2 . Ця сполука може розщеплюватися на воду і кисень під дією ферментів каталази (CAT) і різних пероксидаз (POD) [9].

1.2 Антиоксидантні ефекти

Антиоксиданти борються з окисленням двома основними способами:

1. Нейтралізуючи вільні радикали - первинні антиоксиданти.
2. За допомогою механізмів, які не передбачають прямого знешкодження вільних радикалів – вторинні антиоксиданти.

Первинні антиоксиданти включають фенольні сполуки, такі як α -токоферол, які втрачають активність під час періоду індукції. Вторинні антиоксиданти діють через різні механізми, такі як хелатування іонів металів, поглинання активних форм кисню, перетворення гідропероксидів у нерадикальні форми або поглинання УФ-випромінювання. Вторинні антиоксиданти зазвичай проявляють активність лише в присутності додаткових другорядних компонентів. Наприклад: хелатуючі агенти, такі як лимонна кислота, ефективні лише за наявності іонів металів, тоді як відновники, такі як аскорбінова кислота, потребують первинних антиоксидантів для ефективного функціонування [10]. АФК, такі як: супероксид, пероксид водню, синглетний кисень та інші вільні радикали, генеруються в організмі людини через різні внутрішні джерела або зовнішні фактори. Тобто накопичення АФК, включаючи ROO^{\cdot} , HO^{\cdot} , O^{2-} і 1O_2 , беруть

участь у патофізіології старіння і численних захворювань, таких як: рак, хвороба Альцгеймера і хвороба Паркінсона [11].

Коли баланс прооксидантних та антиоксидантних реакцій порушується, АФК виробляються в надлишку, що призводить до окисного стресу, який порушує нормальні функції клітинних ліпідів, білків, ДНК та РНК. Прооксиданти - це речовини, які можуть спричиняти оксидативне пошкодження різних біологічних мішеней, включаючи вуглеводи, нуклеїнові кислоти, ліпіди та білки.

Антиоксиданти – це речовини, які можуть ефективно відновлювати вільні радикали, але, з іншого боку, це речовини, які, присутні в низьких концентраціях порівняно з окисним субстратом, значно затримують або запобігають окисленню цього субстрату. Цей захист може відбуватися за допомогою різних механізмів, включаючи: пригнічення генерації та здатності до поглинання активних форм кисню (ROS); відновлювальну здатність; хелатування металів; активність гасіння синглетного кисню; та розкладання перекису водню. Антиоксиданти служать захисним фактором проти шкідливого впливу вільних радикалів в організмі. Вони не тільки усувають ROS, але й регулюють окисно-відновний стан клітин та забезпечують передачу окисно-відновного сигналу. Вони діють, пригнічуючи етапи ініціації та поширення окислення, що призводить до припинення реакції та уповільнення процесу окислення [10].

Для того, щоб антиоксидантна дія була ефективною, необхідно виконати три умови:

1. Антиоксидант повинен бути здатним знешкодувати радикали.

2. Знешкодження радикалів повинно бути спрямоване на клітини протягом відповідного часу.
3. Антиоксиданти повинні залишатися активними і не руйнуватися протягом значного періоду часу.

1.3 Аскорбінова кислота як антиоксидант

Аскорбінова кислота - органічна сполука, що належить до групи ненасичених полігідроксиспиртів. Це водорозчинний кетолактон, центр якого утворений п'ятичленним вуглецевим кільцем (рис. 1.3). Сильні відновлювальні властивості аскорбінової кислоти зумовлені наявністю подвійних зв'язків при вуглецах C_2 і C_3 , а також чотирьох гідроксильних груп у положеннях C_2 , C_3 , C_5 і C_6 . Крім того, завдяки близькому розташуванню гідроксильних і карбонільних груп, аскорбінова кислота є ідеальним донором водню або електронів, що робить її кофактором багатьох ферментативних реакцій в живих організмах. Аскорбінова кислота в природі зустрічається в L-конфігурації, і саме ця форма є біологічно активною. D-аскорбінова кислота має схожі фізико-хімічні властивості, але не діє як кофактор ферментів і тому не вважається вітаміном. З іншого боку, окислена форма аскорбінової кислоти, яка називається дегідроаскорбіновою кислотою, лише у випадку L-конфігурації є біологічно активною [12].

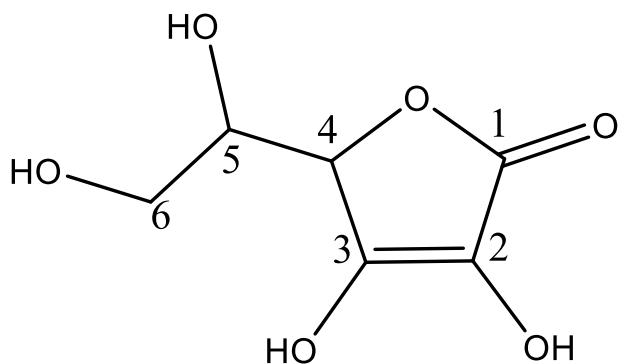


Рис. 1.3 Хімічна структура аскорбінової кислоти із зазначенням атомів вуглецю, які є важливими для антиоксидантних властивостей (C_2 , C_3 , C_5 , C_6), гідроксильними групами та C_2 , C_3 з подвійними зв'язками.

Аскорбінова кислота є одним з основних низькомолекулярних антиоксидантів, що функціонують в організмі людини. Вона бере участь у регуляції активних форм кисню. Аскорбінова кислота регулює рівень АФК вже на етапі їх утворення. Основними джерелами АФК є дихальний ланцюг мітохондрій і специфічні ферменти, такі як НАДФН-оксидази (NOX) або ксантинооксидаза (ХО). ХО - це фермент, який генерує АФК при окисненні гіпоксантину до ксантину, а потім до сечової кислоти. Обидві ці реакції необхідні для функціонування організму, але результатом цього процесу є утворення пероксиду водню і генерація супероксиду [13]. Аскорбінова кислота не впливає на активність ХО у фізіологічних умовах, як це було виявлено у клітинах шкіри (фібробластах і кератиноцитах). Однак у клітинах, що перебувають у стані стресу, спричиненого, наприклад, УФ-випромінюванням або перекисом водню, гіперактивація ХО пригнічується при лікуванні аскорбіновою кислотою. Зниження активності (ХО) під впливом аскорбінової кислоти може знижувати активацію нейтрофілів.

NOX - це група трансмембранних ферментів, які подібно до ХО, генерують супероксид або пероксид водню в якості сигнальних молекул. Контроль цих АФК є критично важливим для належного функціонування. Однак, гіперактивність NOX неминуче призводить до окисного стресу, якому можна запобігти за допомогою аскорбінової кислоти. Як описано у випадку з ХО в клітинах шкіри, аскорбінова кислота не впливає на активність NOX у здорових клітинах. Лише сильні індуктори стресу, такі як перекис водню або ультрафіолетове опромінення, активують NOX настільки сильно, що аскорбінова кислота починає пригнічувати цей фермент [14].

Аскорбінова кислота існує у двох формах з антиоксидантною активністю: L-аскорбінова кислота та L-дегідроаскорбінова кислота. Обидві форми всмоктуються через шлунково-кишковий тракт і можуть ферментативно перетворюватися одна в одну *in vivo*. Вона вважається одним з найпотужніших і найменш токсичних природних антиоксидантів. Однак аскорбінова кислота виконує три основні природні функції, що мають особливе значення для репродукції, і всі вони базуються на її відновних властивостях: вона необхідна для синтезу колагену, вироблення пептидних і стероїдних гормонів та запобігання окисненню біологічних молекул. Цікаво, що концентрація аскорбінової кислоти у фолікулярній рідині людини значно вища, ніж у сироватці крові, що свідчить про активний транспорт проти градієнта концентрації [15]. Міститься у високих концентраціях у багатьох продуктах харчування та рослинах, як водорозчинний вітамін. Аскорбінова кислота зазвичай реагує з окиснювачами, припиняючи ланцюгові радикальні реакції шляхом перенесення електронів. Унікальна здатність переносити один електрон робить її особливо ефективною. Аскорбінова кислота може бути класифікована як енол, де депротонована форма є стабілізованим енолятом (рис. 1.4).

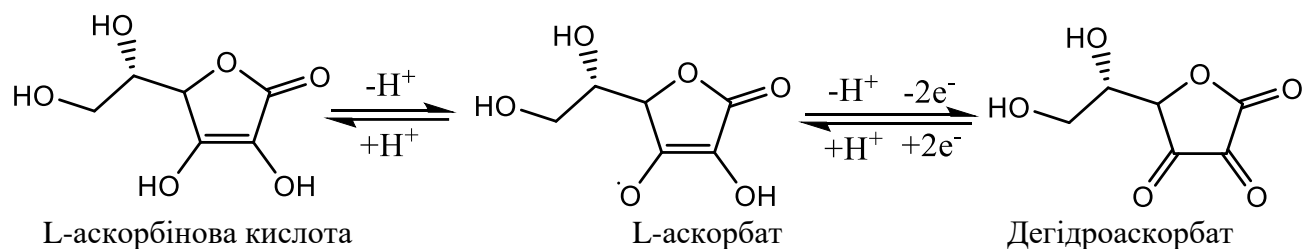


Рис. 1.4 Механізм антиоксидантної дії аскорбінової кислоти

При взаємодії з АФК аскорбінова кислота окислюється до дегідроаскорбату через проміжний вільний радикал аскорбату. Дегідроаскорбат перетворюється назад в аскорбінову кислоту за допомогою ферменту дегідроаскорбатредуктази. Як наслідок, дегідроаскорбат присутній

у значно менших кількостях порівняно з аскорбатом. Аскорбінова кислота як поглинач АФК ефективно нейтралізує $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , 1O_2 . У водному середовищі аскорбінова кислота також ефективно виводить реактивні сполуки оксиду азоту. Аскорбінова кислота визнана високоефективним антиоксидантом, який бере участь у численних фізіологічних і біохімічних процесах. Однак за певних умов вона може діяти як прооксидант. Це відбувається при взаємодії з залізом (Fe) і міддю (Cu), в результаті чого Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+} , а Cu^{3+} — до Cu^{2+} , які потім відновлюють H_2O_2 до OH^{\cdot} [16]. Крім того, деякі фенольні антиоксиданти втрачають свою активність при вищих концентраціях і можуть діяти як прооксиданти, ініціюючи окислювальні реакції [17].

1.4 Антибактеріальні властивості графену та його похідних

Дотепер як наповнювачі для армування полімерних матриць використовували широкий спектр антимікробних агентів, включаючи наночастинки металів, наночастинки оксидів металів [18] та вуглецеві наноматеріали. Нещодавно графен (G) та його похідні (рис.1.5): оксид графену (GO), відновлений оксид графену (rGO) та графенові квантові точки (GQD) стали ефективними антимікробними агентами для боротьби з грибками та бактеріями [19].

Графен - це атомарно тонкий двовимірний шар атомів вуглецю sp^2 у формі сот. Він має поєднання унікальних властивостей: високу жорсткість і міцність, підвищену тепло- і електропровідність, дуже високу рухливість електронів, молекулярну бар'єрну здатність та низьку токсичність [20]. Враховуючи ці фактори було докладено багато зусиль до інтеграції G в полімерні матриці для створення нанокмпозитів на основі полімерів з високоефективними властивостями завдяки синергетичним ефектам. Тим не менш, використання чистого G було обмежене через його нерозчинність у

водних середовищах і сильну тенденцію до агломерації внаслідок Ван-дер-Ваальсової взаємодії між листами. Для вирішення цієї проблеми в якості нанонаповнювачів у полімерних нанокомпозитах було використано декілька похідних графену, включаючи GO, rGO та GQD. GO - це окислена форма G, яка містить епоксиди, гідроксили і карбоніли на базисних площинах і карбонові кислоти на ребрах (рис. 1.5). Завдяки приєднаним функціональним групам, він має здатність до поверхневої функціоналізації, оброблюваності у воді, амфифільності, біосумісності та здатності взаємодіяти з тканинами і біологічними клітинами [21]. GO може бути частково відновлений до графеноподібних листів шляхом усунення кисневмісних груп з відновленням спряженої структури, що призводить до отримання відновлених листів GO (rGO) [22]. Нещодавно з'явилися графенові квантові точки (GQD) (рис. 1.1), які в основному є графеновими сферичними наночастинками з розміром менше 100 нм. Завдяки своїм чудовим властивостям, таким як висока розчинність у різних розчинниках, висока питома поверхня, універсальність, стабільна фотолюмінесценція, хімічна стабільність, низька токсичність і сильний ефект квантового утримання, GQD розглядаються як новий матеріал для біологічних, оптоелектронних, енергетичних та екологічних застосувань.

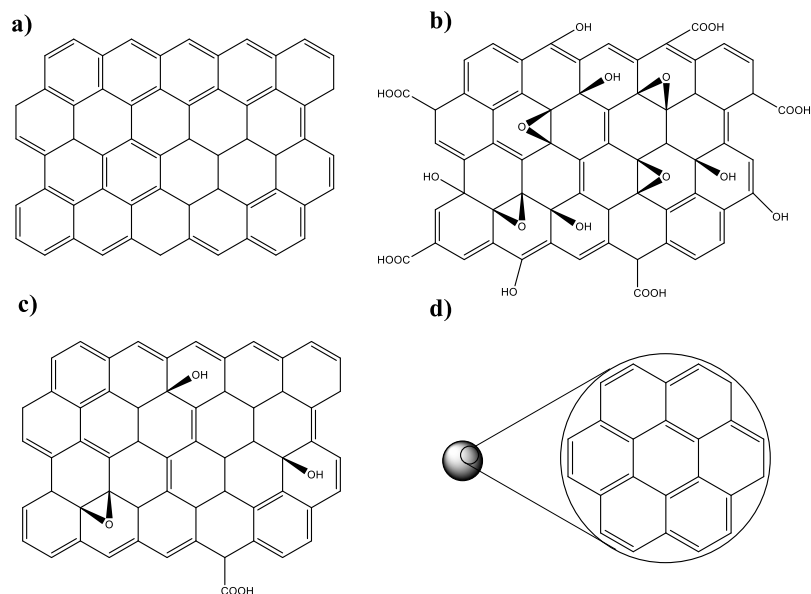


Рис. 1.5 Хімічна структура а) графену (G), б) оксиду графену (GO), в) відновленого оксиду графену (rGO), д) графенових квантових точок (GQD).

Антимікробна дія наноматеріалів на основі G є похідною як від мембранного, так і від окисного стресу. Запропоновано триступеневий антимікробний механізм, який складається із початкового осадження клітин на наноматеріали, викликання мембранного стресу, внаслідок прямого контакту з гострими наноматеріалами, генерацію АФК, що спричиняє окисний стрес через перенесення електронів [23].

Антибактеріальна активність G, GO та rGO порівняна по відношенню до бактеріальної моделі E.coli. За однакових умов GO показав найвищу антибактеріальну активність, за ним йшли rGO, та G. Форма, розмір, поверхневі функціональні групи та електронна структура наноматеріалів на основі G мають значний вплив на антибактеріальну активність. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) та динамічне розсіювання світла (DLS) показали, що наноструктури GO мають найменший середній розмір серед чотирьох типів матеріалів. Зменшення розміру призводить до сильнішого

окисного стресу. Крім того, кількість кисневмісних функціональних груп обумовлює антибактеріальну дію [24].

1.5 Антиоксидантні властивості графен оксиду

Реакційна здатність GO з АФК є цікавою через свою актуальність для практичного застосування, токсичністю та трансформацією в біологічних і природних системах. Гідроксильний радикал ($\text{HO}\cdot$) може виступати як окисник для розкладання GO на квантові точки графену, що підтверджується результатами мікроскопії, спектроскопічного аналізу та мас-спектрометрії [25]. Також $\text{HO}\cdot$ є агентом, відповідальний за розкладання GO під дією сонячного випромінювання [26]. Для оцінки константи швидкості реакції $\text{HO}\cdot$ та ін. опромінили 100 мМ H_2O_2 для отримання $\text{HO}\cdot$ і виміряли деградацію розчиненого органічного вуглецю у GO [27]. Однак отримане значення залишається невизначеним через одночасне існування прямого фотолізу та реакції з $\text{HO}\cdot$. GO сам по собі може генерувати $^1\text{O}_2$ шляхом фотолізу або каталітичного розкладання H_2O_2 [28]. Незважаючи на те, що деякі дослідження показують, що $^1\text{O}_2$ беруть участь у фотоокисленні графену [29], реакційна здатність GO з $^1\text{O}_2$ ще не підтверджена. Позаклітинний $\text{O}_2^{\cdot-}$ зменшує GO в сольовому розчині в темряві [30], але результати щодо визначення швидкості даної реакції залишаються обмеженими. Наразі існує лише декілька досліджень для кількісного визначення швидкості реакцій між GO та окремими АФК, особливо за відсутності прямого фотолізу.

Сенча-Глевацька та ін. показали, що GrO та його похідні мають виражений інгібуючий ефект на окисні процеси, спричинені ішемією-реперфузією у серцевій тканині. GrO суттєво знижував швидкість утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$ та $\text{HO}\cdot$. Водночас зразки графену продемонстрували не менш значний антирадикальний ефект. Усі досліджені зразки графена значно знизили вміст

продуктів перекисного окислення ліпідів у серцевій тканині після ішемії-реперфузії, підтверджуючи свої антиоксидантні властивості [31].

1.6 Графен-полімерні нанокompозити для доставки ліків

Враховуючи унікальні властивості двовимірних (2D) шарів графену, а саме: високе співвідношення сторін, біосумісність та простота модифікації, багато вчених зацікавились у використанні графену у системах доставки ліків [32]. Оскільки наноматеріали з графену мають на 200% навантажувальну здатність більше, ніж наночастинки, їх використання може сприяти вдосконаленню системі доставки ліків [33]. У контексті доставки ліків, графен випереджає інші наноматеріали, маючи більшу площу поверхні [34]. Взаємодія ліків може відбуватися за допомогою різних методів, включаючи ковалентну π - π взаємодію та H-зв'язки [35]. Крім того, ліки можна наносити на графен, а розподіл ліків можна модулювати за допомогою електричного контролю [36,37]. Різноманітні композиції нанокompозитів на основі графену та полімерів використовувалися для створення систем доставки лікарських засобів, спрямованих на забезпечення потрібного терапевтичного ефекту [38].

Біосумісний носій, на основі GO, модифікований хітозаном, а потім кон'югований з гіалуроновою кислотою, був описаний Лю та ін. для введення протиракового препарату (SNX-2112) для лікування раку легенів [39]. Результати продемонстрували, що велика поверхня GO, яка посилювала адсорбцію SNX-2112 за допомогою π - π та гідрофобних взаємодій, дозволила досягти здатності до навантаження лікарського засобу на 110% і більше, як для GO, так і для його полімерних нанокompозитів. Однак, порівняно з дещо нейтральним pH (7,4), загальне вивільнення лікарського засобу було набагато більшим у кислому середовищі (pH 5,5). Дослідники зосереджуються на доставці терапевтичних препаратів у цільові зони із максимальною абсорбцією [40]. Х. Ян та ін. функціоналізували GO карбоксиметилхітозаном

та наноосієм гіалуронової кислоти для перорального введення доксорубіцину [41]. Дані показали значне вивільнення лікарського засобу в умовах рН 5,8, характерних для пухлинних клітин, ніж при рН 7,4. Ефективність інкапсуляції лікарського засобу досягла близько 95% з конкретним націлюванням на ракові клітини. В іншому дослідженні С. Джаванбахт та його команда розробили нетоксичний наноосій (близько 80 нм) для протиракового препарату (доксорубіцину) за допомогою екологічного одностадійного сольвотермічного методу. Вони модифікували фізико-хімічні властивості нанолістів GO, такі як розчинність, навантаження лікарського засобу, а також поверхневі заряди, в присутності карбоксиметилцелюлози та металоорганічних каркасів (MOF) на основі цинку. Результати навантаження лікарського засобу показали кращу інкапсуляцію лікарського засобу для виготовленого наноосія, ніж для GO окремо, завдяки різним взаємодіючим зв'язкам, таким як електростатична взаємодія, π - π та Н-зв'язки. Було повідомлено про підвищення вивільнення лікарського засобу при рН пухлинних клітин вище рН 7,4 [42].

Розділ 2. Експериментальна частина

2.1 Матеріали та реактиви

Чистий GrO був отриманий від компанії «Grafren AB» (Швеція) у вигляді темно-коричневої водорозчинної пасти (20–25 % маси), синтезованої відповідно до стандарту ISO/TS 80004-13:2017 (E) «Графен та пов'язані з ним двовимірні 2D матеріали». Кількість шарів 10–15, розмір пластівців 0,1–200 мкм, атомне співвідношення C/O функціональних груп на поверхні становить 2,5–2,6.

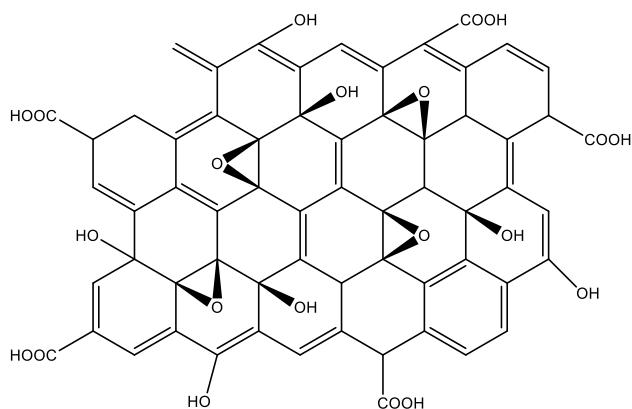


Рис. 2.1 Структурна формула графен оксиду

Для синтезу графен оксид полімерних наноккомпозитів були використані: полівінілпіролідон (PVP) із молекулярною масою 7-11 кДа (Merck), L-аскорбінова кислота (Sigma-Aldrich, США) та нікотинова кислота від компанії «Хімлаборреактив» (Китай) із вмістом основної речовини 100,14%, етиловий спирт технічний.

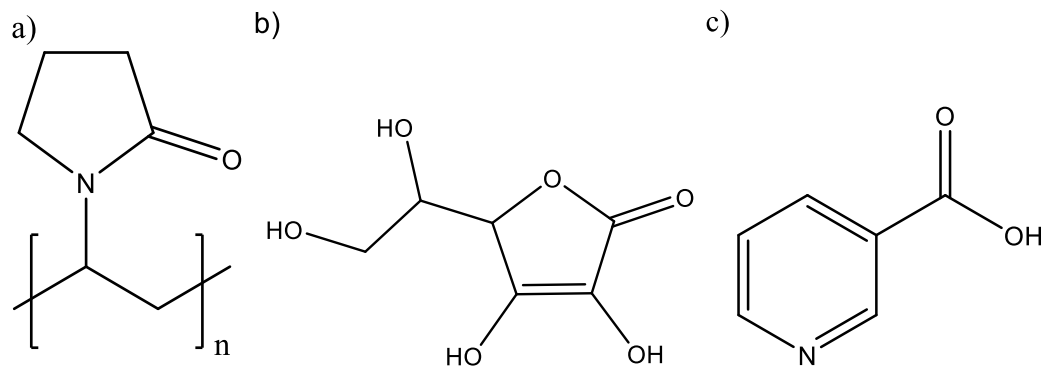


Рис. 2.2 Структурні формули: а) полвінілпіролідону (PVP), б) аскорбінової кислоти та с) нікотинової кислоти

Інші розчинники та реагенти, які використані в дослідженні, були аналітичного класу та без додаткових очищень.

2.2 Методи дослідження

Визначення концентрації PVP проводилося методом калібрувальної кривої. Для цього була підготовлена серія розчинів із концентрацією PVP (0,06 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,1 мг/мл), які були виміряні спектрофотометрично при довжині хвилі 220 нм Отримані наступні результати:

Таблиця 1. Залежність оптичної густини від концентрації PVP

C(мг/мл)	A
0.04	0.207
0.06	0.334
0.08	0.472
0.1	0.593

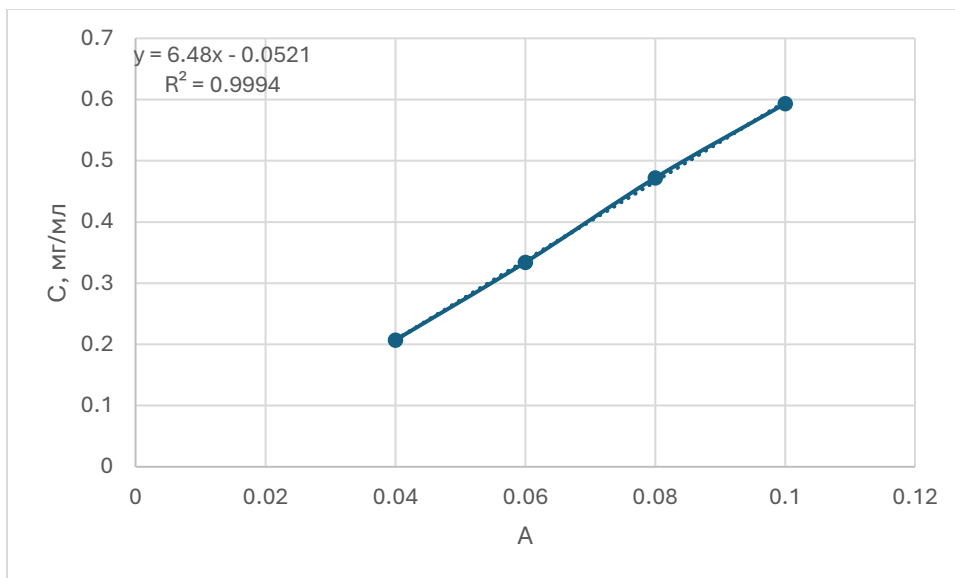


Рис. 2.3 Залежність концентрації полімеру (PVP) від оптичної густини

Концентрація була обрхована за формулою (2.2):

$$C = \frac{A-b}{a}, \quad (2.2)$$

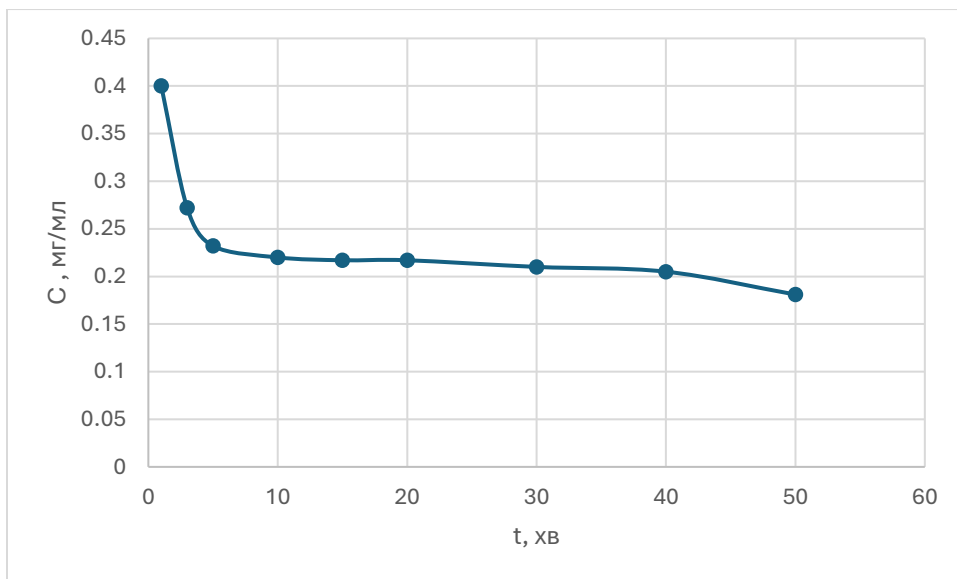
де a, b – константи, виведені із лінійного рівняння; A – оптична густина.

$$C = \frac{0,593 + 0,052}{6,48} = 0,1 \text{ мг/мл}$$

Адсорбційну ємність визначали експериментально. У 100 мл водного розчину PVP ($C=0,1$ мг/мл) розчинили 50 мг GO та вимірювали оптичну густина протягом 50 хвилин. Концентрація була обрхована за формулою (2.2). У таблиці 2 наведені отримані результати.

Таблиця 2 Залежність часу від оптичної густини, обрахована концентрація

t, хв	A	C, мг/мл
1	0.4	0.07
3	0.272	0.05
5	0.232	0.044
10	0.22	0.042
15	0.217	0.041
20	0.217	0.041
30	0.21	0.04
40	0.205	0.039
50	0.181	0.036

**Рис. 2.4** Залежність залишкової концентрації PVP від часу

Адсорбційну ємність розраховували за формулою (2.3), що становить 170 мг/г.

$$a = \frac{(C_0 - C) * V}{m}, \quad (2.3)$$

де C_0 , C – початкова та кінцева концентрації відповідно (мг/мл), V – об'єм розчину (мл), m – маса сорбенту (г).

Для оцінки антиоксидантних властивостей графен оксид полімерні наноккомпозити були отримані методом прямого змішування та нагрівання. Для зразку GO-PVP: взято 0,2 г полівінілпіролідону та 0,1 г GO, які були розчинені в 100 мл етилового спирту. Розчин нагрівався на магнітній мішалці, при 50°C протягом чотирьох годин. Після охолодження розчин розділяли за допомогою шприцевого мембранного фільтру з розміром пор 0,2 мкм відфільтрований окремо на GO-PVP та етиловий спирт. Зразок висушувався у сушильній шафі, при 37°C протягом однієї доби. Для зразку GO-PVP-L-аскорбінова кислота: взято 0,2 г полівінілпіролідону, 0,1 г GO та 0,32 г L-аскорбінової кислоти, які були розчинені в 100 мл етилового спирту. Для зразку GO-PVP-нікотинова кислота: взято 0,2 г полівінілпіролідону, 0,1 г GO та 0,22 г нікотинової кислоти, які були розчинені в 100 мл етилового спирту. Останні два зразки отримані за методикою GO-PVP.

1. GO-PVP
2. GO-PVP-L-аскорбінова кислота
3. GO-PVP-нікотинова кислота

Структура синтезованих зразків була підтверджена методом інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є. ІЧ-Фур'є спектри були записані за допомогою IR Tracer 100 (Shimadzu, Японія) з використанням алмазного кристала. Отримані спектри були результатом об'єднання 20 інтерферограм, отриманих з роздільною здатністю 4 см⁻¹.

Розміри синтезованих наноккомпозитів та їхню стабільність при різних рН визначали методом динамічного світлорозсіювання (DLS). Вимірювання проводилося за допомогою аналізатору розміру частинок Zetasizer Nano ZS. Прилад оснащений лазером He – Ne (потужність 4 мВт). Розчини, об'ємом 1

мл було поміщено до кювети на основі полістиролу (тип DTS0012). Розчини для аналізу наведені у таблиці 3.

Таблиця 3. Розчини для DLS аналізу

C(GO-PVP)	Розчинник	pH
40мкг/мл	Дистильована вода	6,13
40мкг/мл	Натрію хлорид	5,4
40мкг/мл	Ацетатний буфер	4,2
40мкг/мл	Фосфатний буфер	7,4

Антиоксидантні властивості графен оксид полімерних наноконкомпозитів були дослідженні методом волюмометрії. У реакціях розкладання пероксиду водню та кумен гідропероксиду.

Колбу із розчином пероксиду поміщали у термостат та нагрівали до 36,6°C, температуру вимірювали термометром, після нагрівання до розчину додавали каталізатор (1 мл, C=0,02 г/л) та закривали корком, який під'єднаний до мікробюретки. Вимірювали об'єм кисню, який виділяється із розкладанням пероксиду. Розкладали перекис водню (H₂O₂) протягом 5 хвилин та гідропероксид кумолу (ГПК) протягом півтори хвилини. Для цього готували серію розчинів із різними концентраціями, дані наведені у таблиці 4.

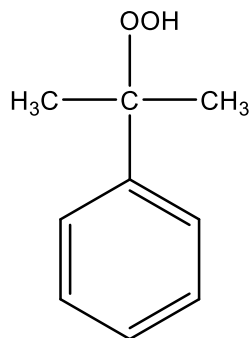


Рис. 2.5 Структурна формула гідропероксид кумену

Таблиця 4 Розчини для оцінки антиоксидантних властивостей синтезованих графен оксид полімерних наноконкомпозитів

С(H ₂ O ₂), %.	Розчинник:	0.005	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08
фосфатний буфер (Na ₂ HPO ₄ + KН ₂ PO ₄), рН=7.4. V=25 мл							
С (ГПК), mM.	Розчинник:	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
ацетонітрил. V=10 мл							

Оптимальну концентрацію каталізатора визначали волюмометричним методом. Для цього розкладали 25 мл H₂O₂ у фосфатному буфері протягом 5 хвилин, з різною концентрацією каталізатора GO. На рис. 2.6 зображена залежність концентрації каталізатора від об'єму виділеного кисню. Отже, найбільша активність каталізатора буде при його концентрації 0.02 г/л. Після даної концентрації активність зменшується, що може свідчити про агрегацію каталізатора або інгібуючий ефект.

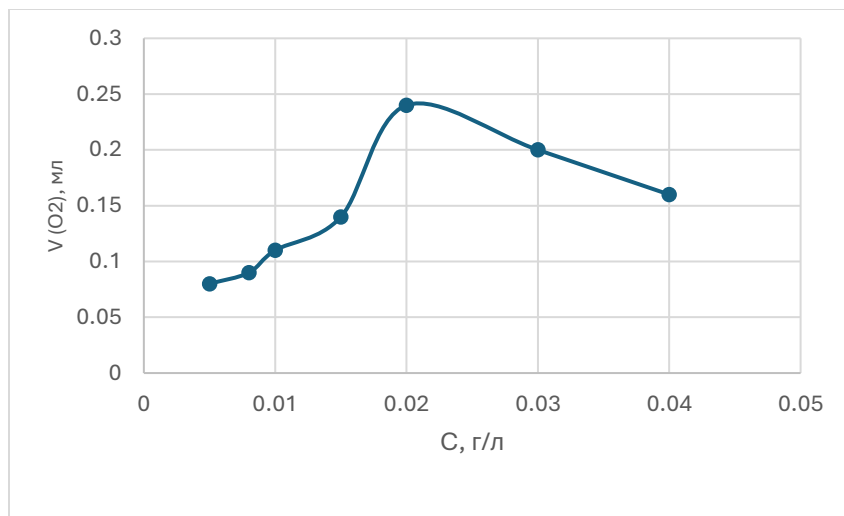


Рис. 2.6 Залежність концентрації каталізатора від об'єму виділеного кисню

Морфологію синтезованого зразка досліджували методом мікроскопії, а саме: сканувальної електронної (SEM) та атомно-силової (AFM).

Розділ 3. Аналіз та узагальнення результатів дослідження

3.1 Аналіз синтезованих структур графен оксид полімерних нанокомпозитів

На рисунку (3.1) зображені ІЧ Фур'є-спектри GO, PVP та GO+PVP. Спектр графен оксиду складається з груп коливань, що включають смуги: $\nu(\text{O-H})$ 3400 cm^{-1} , $\nu(\text{C-OH})$ 1065 cm^{-1} , $\nu(\text{C=C})$ (1650 cm^{-1}). Спектр PVP складається з груп коливань, що включають смуги: $\nu(\text{C=O})$ 1650 cm^{-1} , $\nu(\text{C-N})$ $1290\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ та $\delta(\text{C-H})$ $650\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$.

З поверхнею GO можливі два типи водневих зв'язків (за участю атомів азоту та карбонільних груп) PVP [43]. Однак через сферичні обмеження атоми азоту PVP будуть утворювати слабші водневі зв'язки, тоді як карбонільні групи будуть міцнішими [44]. Спектр синтезованого GO+PVP зберігає смуги C=O та C-N, але зі зменшенням інтенсивності.

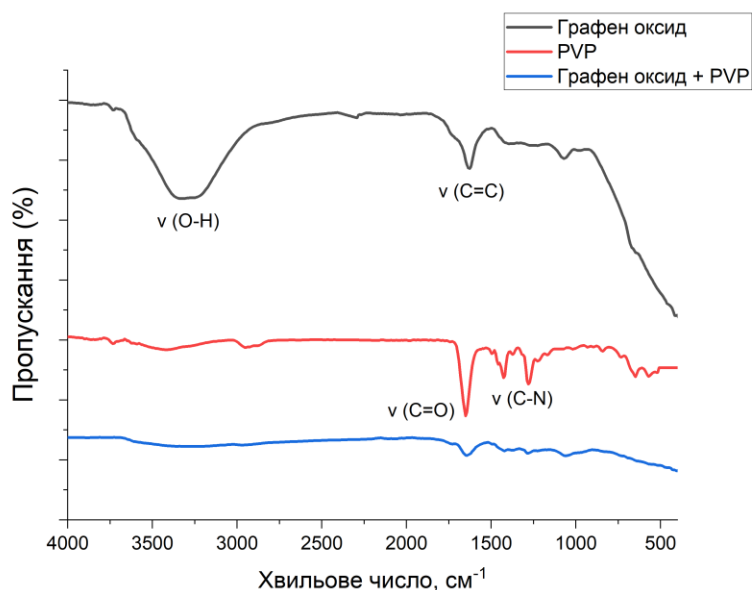


Рис. 3.1 ІЧ Фур'є-спектри графен оксиду, полівінілпіролідону та синтезованого GO+PVP

На рисунку (3.2) зображений спектр L-аскорбінової кислоти та синтезованого нанокompозиту (GO-PVP-L-аскорбінова кислота). Спектр L-аскорбінової кислоти складається з груп коливань, що включають смуги: $\nu(\text{O-H})$ 3300-3550 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ 1750 cm^{-1} , $\nu(\text{C-C})$ та $\nu(\text{C-O})$ 1000-1600 cm^{-1} , також деформаційні коливання: C-H 750-1000 cm^{-1} . Піки, присутні в області 990–1027 cm^{-1} , пов'язані з деформацією лактонового кільця. З додаванням графен оксиду та PVP інтенсивність піків зменшується, а також з'являється смуга $\nu(\text{C-H})$ 2300 cm^{-1} , що вказує на утворення водневих зв'язків.

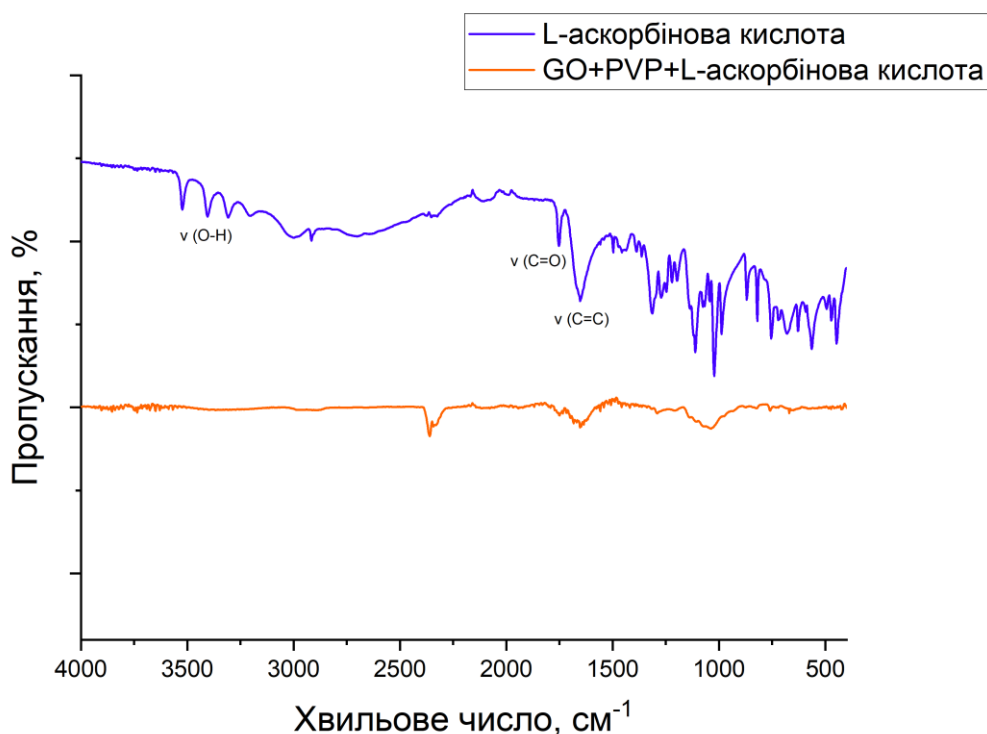


Рис. 3.2 ІЧ Фур'є-спектри L-аскорбінової кислоти та синтезованого GO+PVP+L-аскорбінова кислота

На рис. (3.3) зображений спектр ніотинової кислоти та синтезованого GO+PVP+ніотинова кислота. Спектр ніотинової кислоти складається з груп коливань, що включають смуги: $\nu(\text{C-N})$ 1300 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ 1700 cm^{-1} , $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ 1417 cm^{-1} , $\delta(\text{C-H})$ 700-900 cm^{-1} .

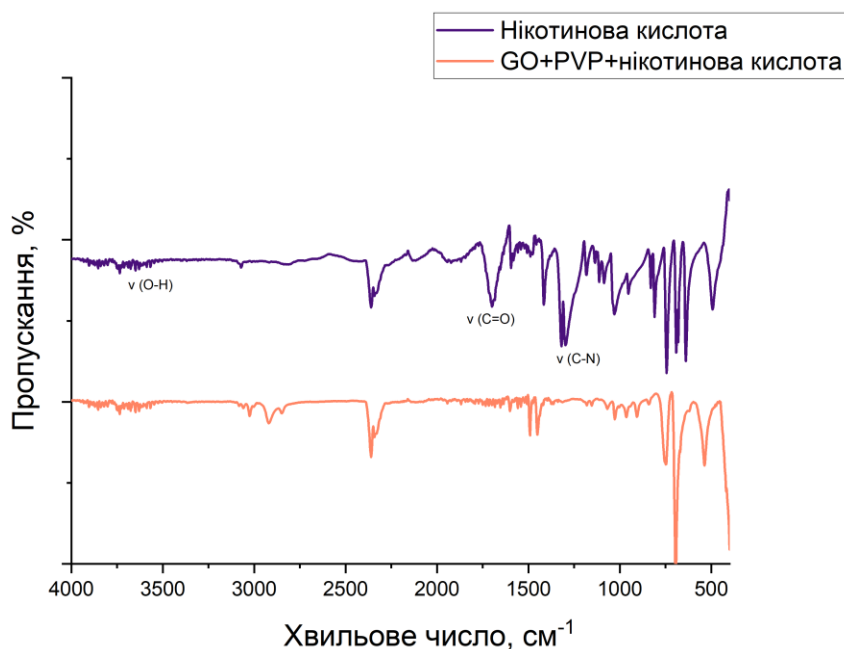


Рис. 3.3 ІЧ Фур'є-спектри нікотинової кислоти та синтезованого GO+PVP+нікотинова кислота

3.2 DLS аналіз синтезованих графен оксид полімерних нанокompatитів

Метод динамічного світлорозсіювання використовується для оцінки середніх розмірів колоїдних частинок. До основних переваг методу належать: коротка тривалість експерименту, можливо досліджувати зразки із частинками, які відрізняються за розміром і молекулярною масою, малий об'єм досліджуваного зразка. Метод динамічного розсіювання світла використовують за мінімальних концентрацій частинок у зразку. Так концентрація частинок нанокompatиту GO+PVP складала 40 мкг/мл. Це дозволяє нехтувати ефектом вторинного розсіювання світла, за умови, коли відстань між частинками значно більша їх розмірів.

Принцип методу полягає у вимірюванні флуктуацій інтенсивності розсіяного світла, спричинених броунівським рухом частинок у зразку.

Аналіз цих флуктуацій дає змогу визначити коефіцієнт дифузії, який безпосередньо пов'язаний із розміром частинок.

Зв'язок між розміром частинки та коефіцієнтом дифузії описує рівнянням Стокса-Енштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (3.1)$$

де k – стала Больцмана, T - абсолютна температура, η – в'язкість, r – радіус частинки.

Вимірювання розподілу частинок за розміром і стабільності емульсій проведено за допомогою аналізатору розміру частинок Zetasizer Nano ZS. Прилад оснащений лазером He – Ne (потужність 4 мВт).

Емульсію об'ємом 1 мл поміщують в кювети на основі полістиролу (тип DTS0012). Та проводять вимірювання при довжині хвилі $\lambda = 633$ нм.

Для дослідження стабільності нанокompatитів зразки GO+PVP поміщали в різні буферні системи та отримували суспензії, що мають різне рН середовища. Перелік середовищ та їх рН наведено в таблиці 3. Вимірювання стабільності суспензій проводили через тиждень після приготування.

Як видно з рисунку (3.4), середній розмір частинок нанокompatитів у воді при рН=6 дорівнює близько 500 нм. Спектр демонструє досить монодисперсну систему, що має індекс полідисперсності 0,75.

При приготуванні суспензії у фізіологічному розчині (рис. 3.5), спостерігається незначне збільшення розмірів частинок до 700 нм, проте суспензія є більш монодисперсною, а індекс полідисперсності зменшується до 0,65. Очевидно, що збільшення осмотичного тиску та йонної сили розчину

зменшує дзета-потенціал частинок, що викликає зростання їх гідродинамічного розміру.

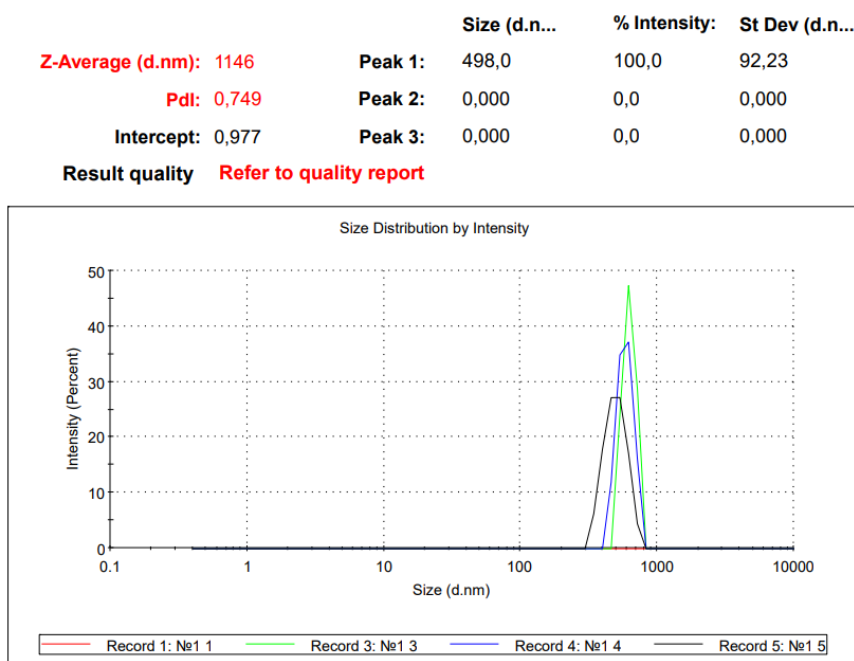


Рис. 3.4 DLS спектр нанокompозиту GO+PVP у воді

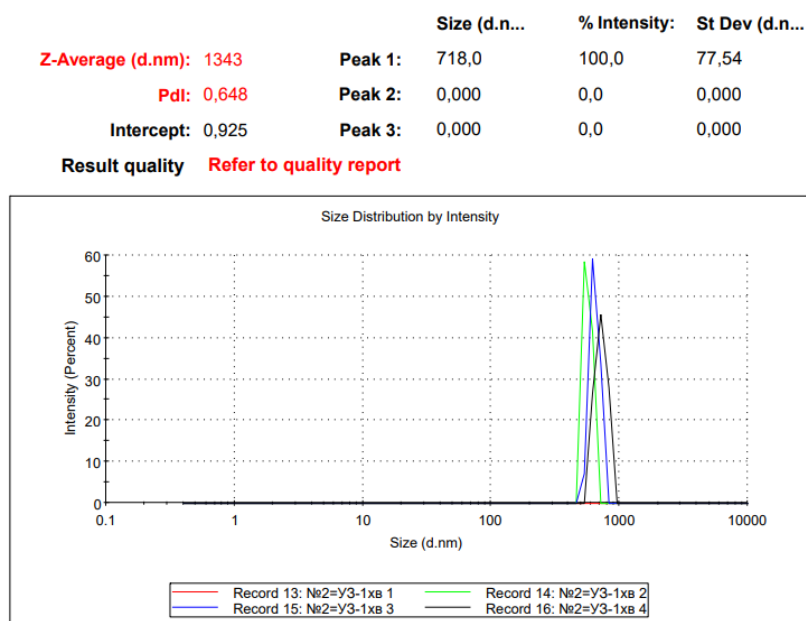


Рис. 3.5 DLS спектр нанокompозиту GO+PVP у NaCl

Наступні дослідження проводили в ацетатному та фосфатному буферах при рН 4 та 7 відповідно. Як видно з рис. (3.6) розмір частинок в ацетатному буфері різко збільшується та становить 8 мкм. А отже при рН 4 відбувається агрегація наночаснок нанокompозиту, що також пояснюється зміною дзета-потенціалу частинок.

У фосфатному буфері спостерігаємо дуже монодисперсну систему з найменшим індексом полідисперсності, що дорівнює 0,47. Розмір частинок при цьому складає 1000 нм.

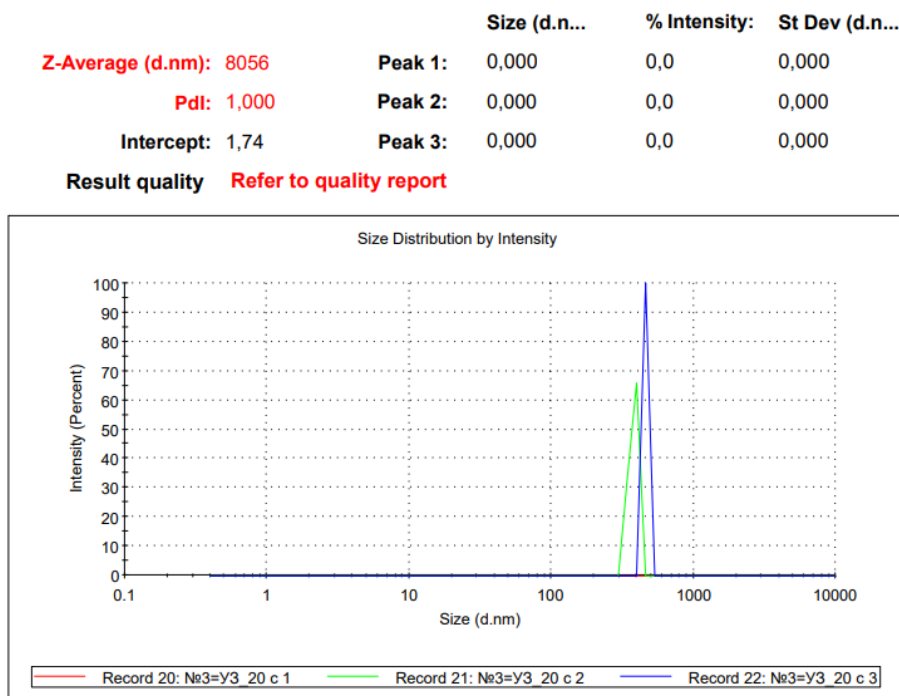


Рис. 3.6 DLS спектр нанокompозиту GO+PVP в ацетатному буфері

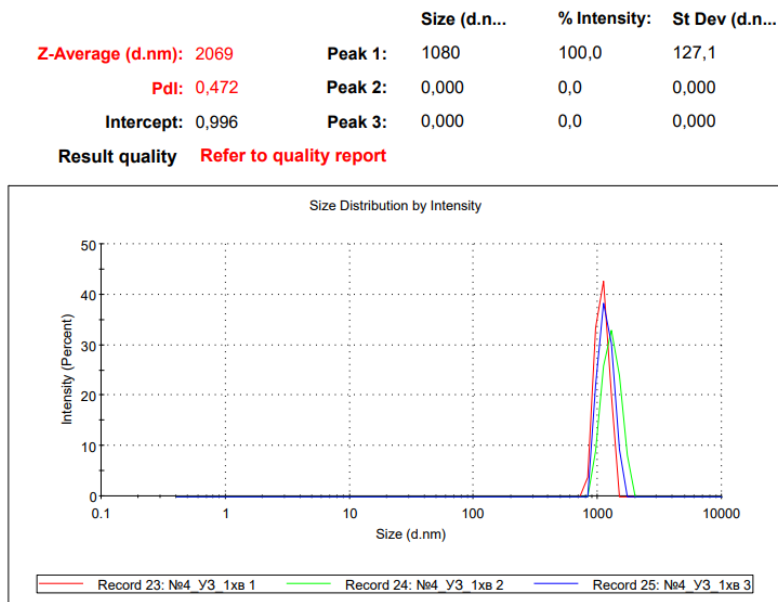


Рис. 3.7 DLS спектр нанокompозиту GO+PVP у фосфатному буфері

3.3 Морфологія синтезованих графен оксид полімерних нанокompозитів

Морфологічну структуру графен оксиду та GO+PVP нанокompозитів досліджували методом сканувальної електронної мікроскопії. Як видно з рис. (3.8) вихідний GO має шарувату структуру притаманну графенам.

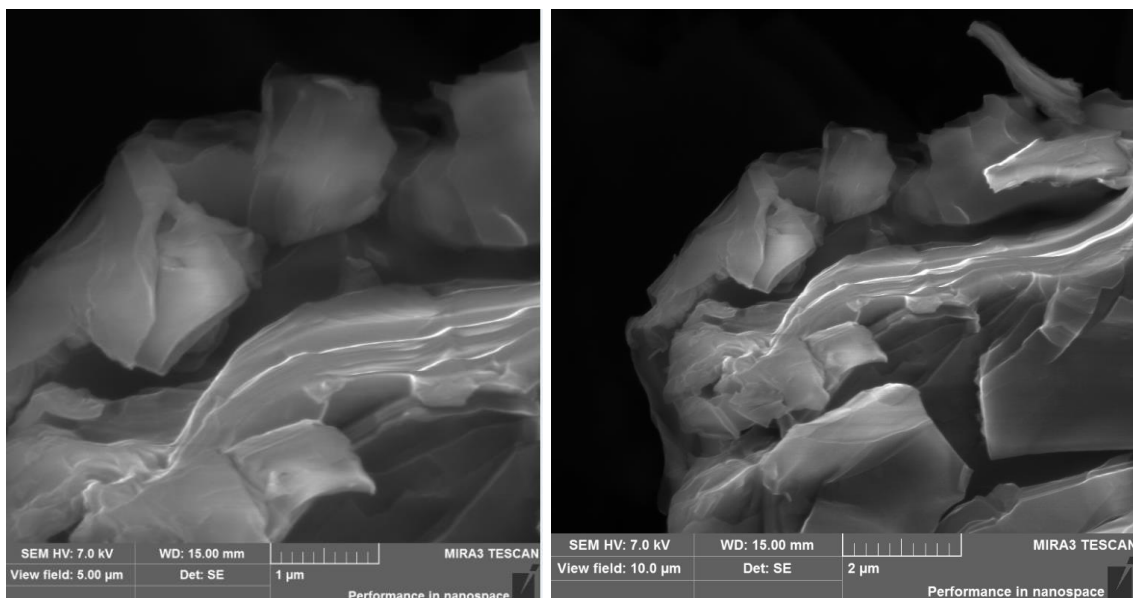


Рис. 3.8 SEM зображення графен оксиду

Як видно з рис. (3.9), після модифікування GO полівінілпіролідом отримані наноконізити зберігають свою шаровату структуру та розміри. Розмір пластівців варіюється в межах 20-100 мкм.

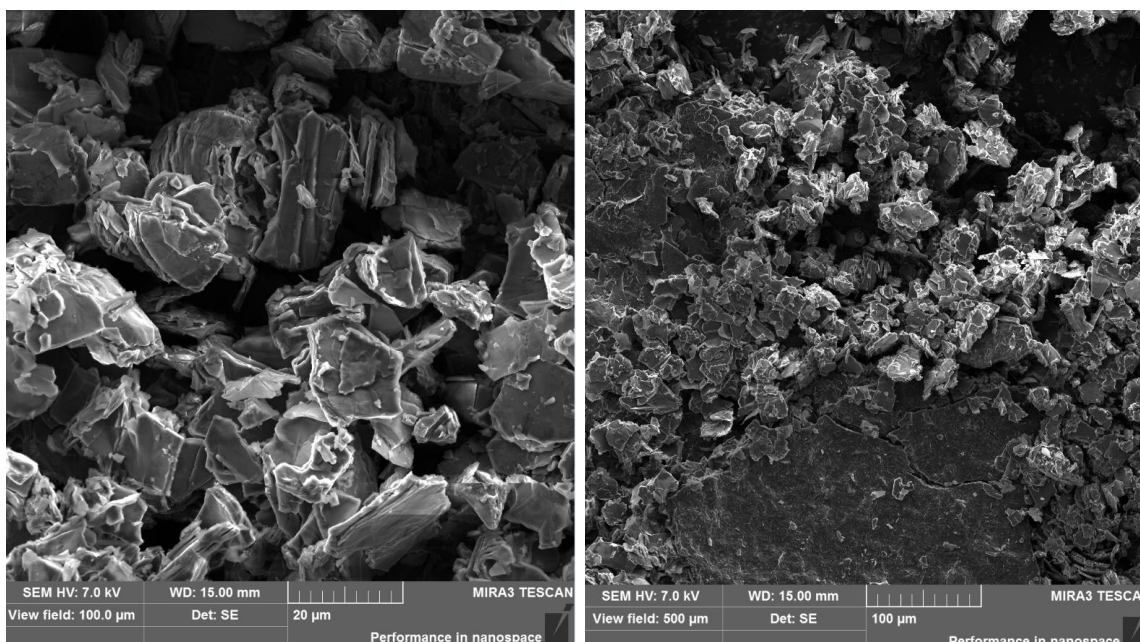


Рис. 3.9 SEM зображення GO+PVP наноконізитів

Елементний аналіз (рис.3.10) доводить модифікування GO полімером, так пік при 0,4 кеВ відповідає наявності нітрогену.

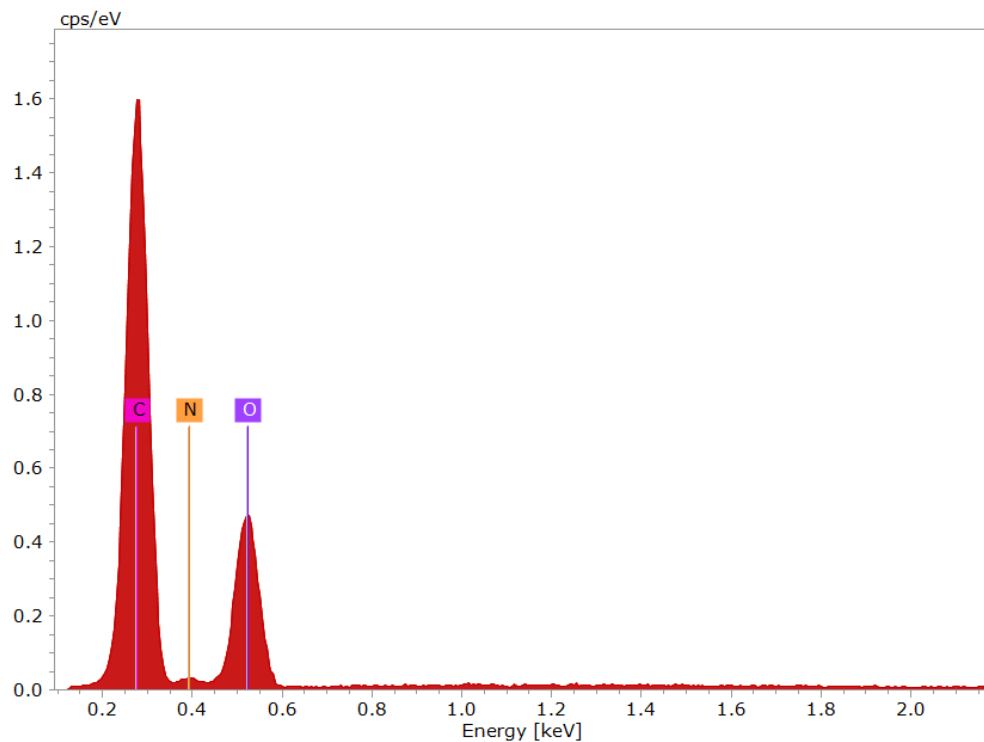


Рис. 3.10 Елементний аналіз GO+PVP композитів

Метод атомно-силової мікроскопії дає змогу оцінити товщину пластівців GO. Як видно на рис. (3.11) товщина GO дорівнює близько 4 нм.

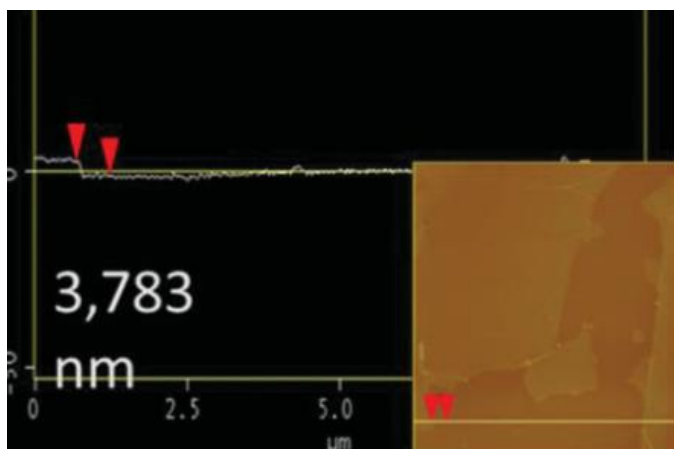


Рис. 3.11 AFM зображення GO

Після модифікування GO полівінілпіролідом та L-аскорбіною кислотою, їх структура також досліджувалась методом AFM.

Як видно з рис. (3.12) та рис. (3.13), GO+PVP та GO+PVP+L-аскорбінова кислота мають двовимірну структуру. Пластівці по ширині мають розміри від 1 до 2 мкм. Тоді як по товщині зберігаються нанорозмірні розміри, що не перевищують 20 нм.

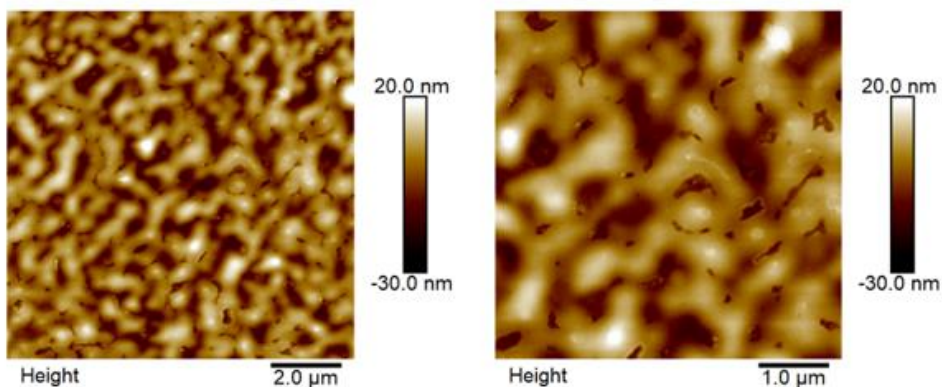


Рис. 3.12 AFM зображення нанокompозиту GO+PVP

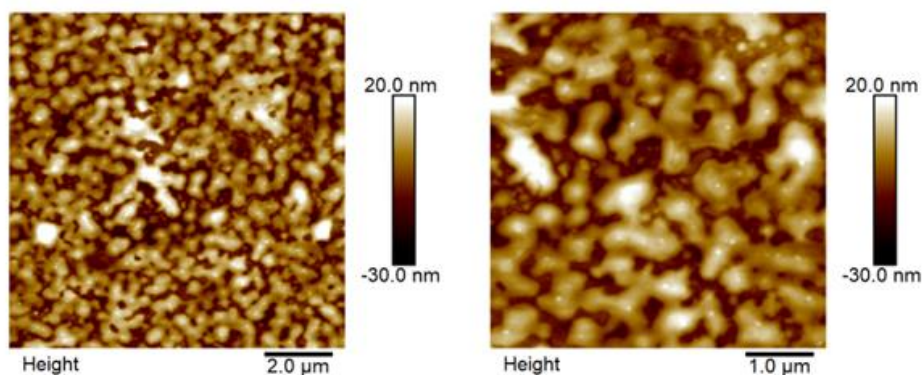


Рис. 3.13 AFM зображення нанокompозиту GO+PVP+L-аскорбінова кислота

3.4 Оцінка антиоксидантних властивостей синтезованих графен оксид полімерних нанокомпозитів

Реакцію розкладання перекису водню використовували для оцінки властивостей GO щодо знешкодження радикалів $\text{OH}\cdot$. Розпад перекису водню під дією GO відбувається за вільнорадикальним механізмом:

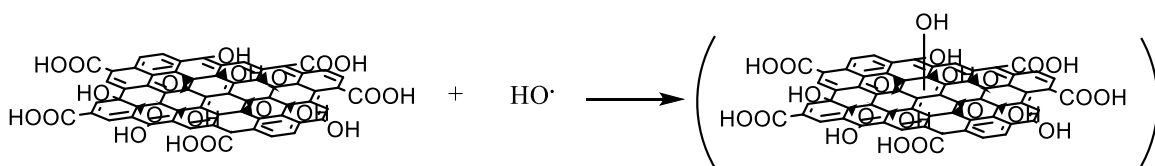
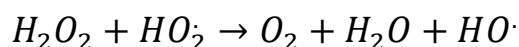
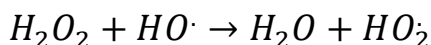


Схема 3.1 Вільнорадикальний механізм розпаду перекису водню

За об'ємом виділеного кисню визначали швидкість та константу швидкості реакції. Так як у гетерогенному каталізі реакція відбувається на поверхні каталізатора, швидкість реакції обраховували за наступною формулою:

$$v = \frac{dC}{dt} * m_k, \quad (3.1)$$

де C – концентрація перекису водню, обрахована відносно виділеного кисню (моль/л), t - час, за який проходила реакція (с), m_k – маса каталізатора (г)

Константу швидкості визначали графічно за виведеним рівнянням реакції, за формулою:

$$k_v = 10^{-b} \quad (3.2)$$

На рисунках зображені залежності логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду перекису водню, зі збільшенням концентрації спостерігається зростання швидкості розпаду перекису водню, що свідчить про каталізуючу дію GO, PVP та GO+PVP. PVP відіграє роль стабілізатора, який запобігає агломерування GO, збільшуючи активну поверхню каталізатора.

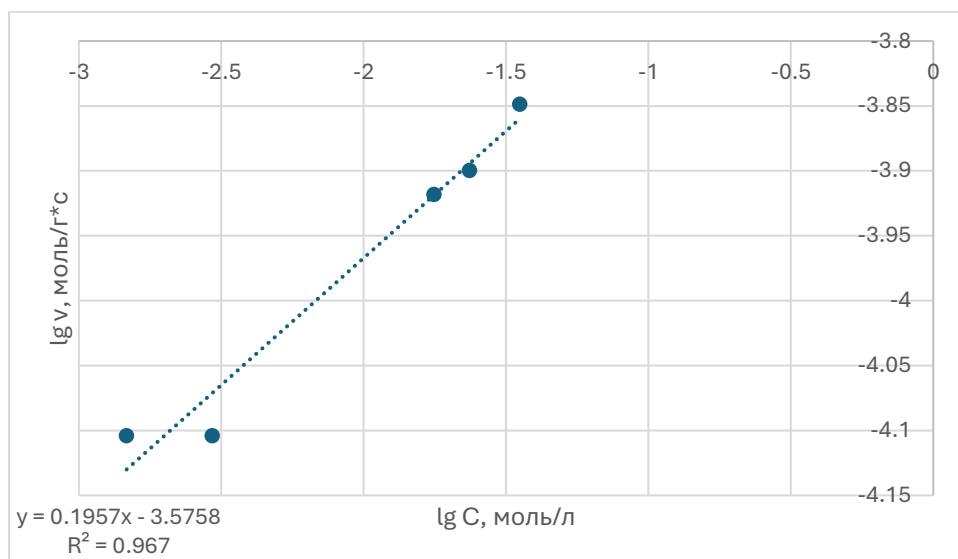


Рис. 3.14 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду H_2O_2 , каталізатор – GO

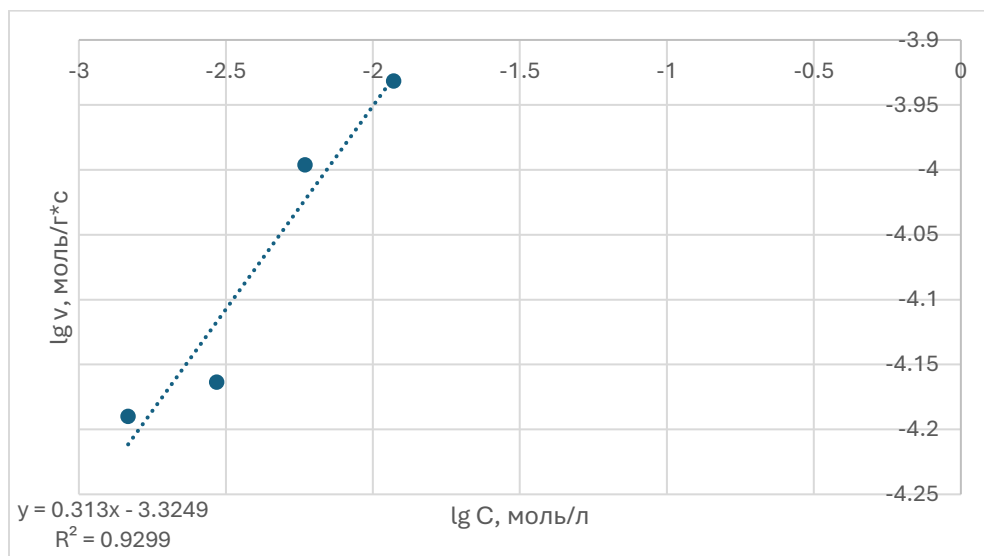


Рис. 3.15 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду H_2O_2 , каталізатор – PVP

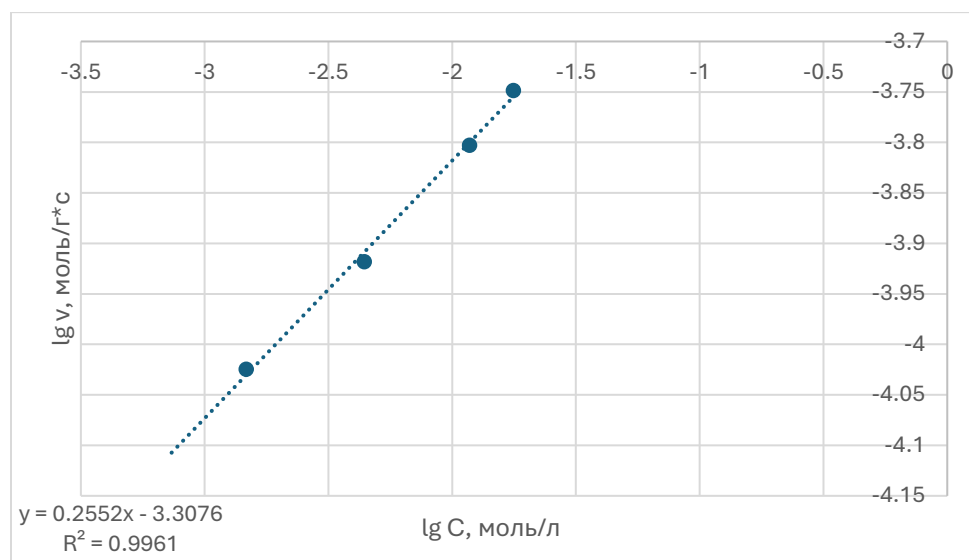


Рис. 3.16 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду H_2O_2 , каталізатор – GO+PVP

Аскорбінова кислота та ніотинова кислота окислюються під дією перекису водню та втрачають свої антиоксидантні властивості, також можливе відновлення GO, що погіршує його каталітичні та антиоксидантні властивості. У таблиці 5 наведені константи швидкості розпаду H_2O_2 , де найкраще значення константи швидкості має GO+PVP $4,92 \cdot 10^{-4}$. GO + PVP демонструє підвищену каталітичну активність, ймовірно, завдяки поліпшеній дисперсії GO та збереженню його активних центрів у полімерному середовищі, а також спостерігається явний синергетичний ефект реакції. Чистий PVP також демонструє високу каталітичну активність.

Таблиця 5 Константи швидкості розпаду пероксиду водню

	k, s^{-1}
GO	$2,65 \cdot 10^{-4}$

PVP	$4,73 \cdot 10^{-4}$
GO+PVP	$4,92 \cdot 10^{-4}$
GO+PVP+L-аскорбінова кислота	$2,19 \cdot 10^{-4}$
GO+PVP+нікотинова кислота	$2,23 \cdot 10^{-4}$

Реакцію розкладання гідропероксид кумену використовували для дослідження здатності графенової поверхні нейтралізувати великий органічний радикал – кумоїл пероксильний радикал, та його другу частину - OH^\cdot в органічному середовищі із розривом O-O зв'язків. Розпад гідропероксид кумену під дією GO відбувається за механізмом:

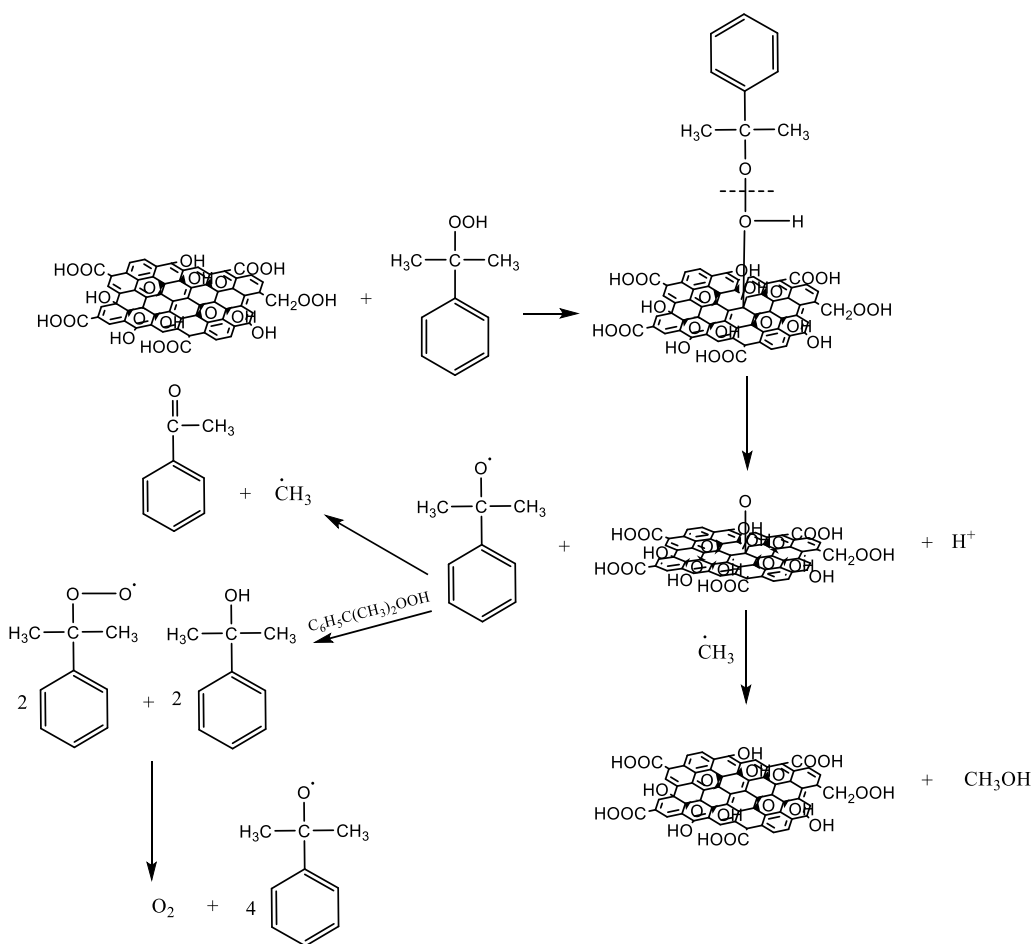


Схема 3.2 Механізм розпаду гідропероксид кумену

За об'ємом виділеного кисню визначали швидкість та константу швидкості реакції. Обрахунки проводилися за формулами (3.1) та (3.2). З наведених нижче рисунків бачимо, що зі збільшенням концентрації зростає швидкість реакції.

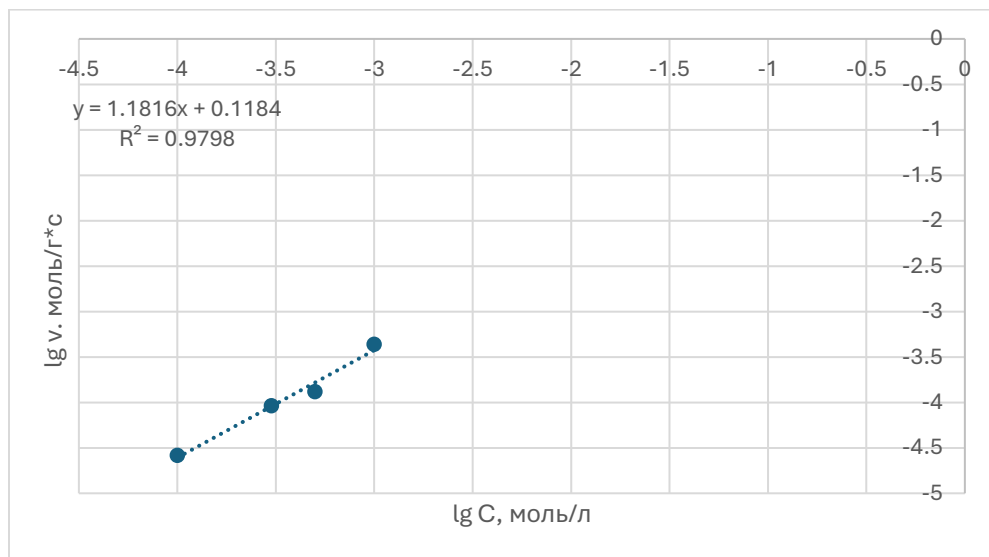


Рис. 3.17 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду гідропероксид кумену, каталізатор – GO

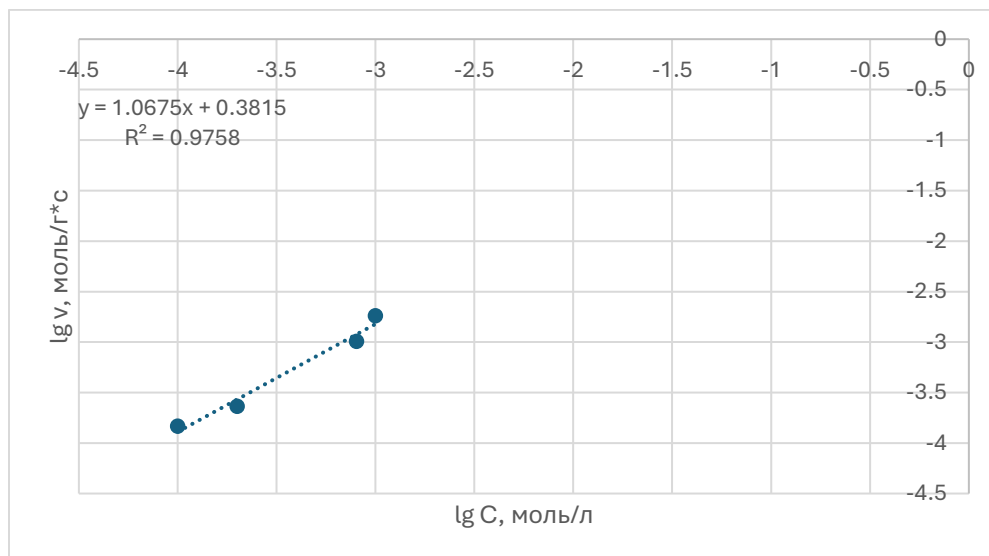


Рис. 3.18 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду гідропероксид кумену, каталізатор – PVP

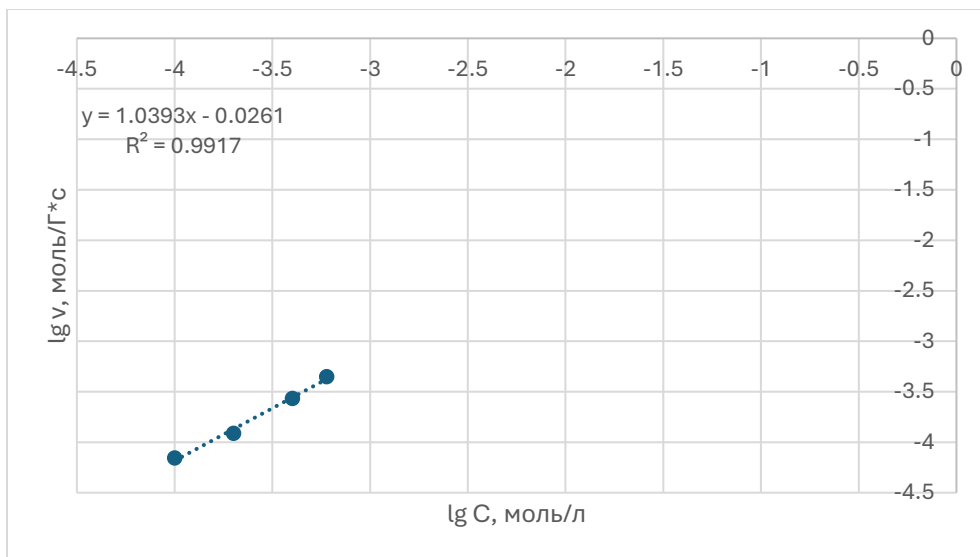


Рис. 3.19 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду гідропероксид кумену, каталізатор – GO+PVP

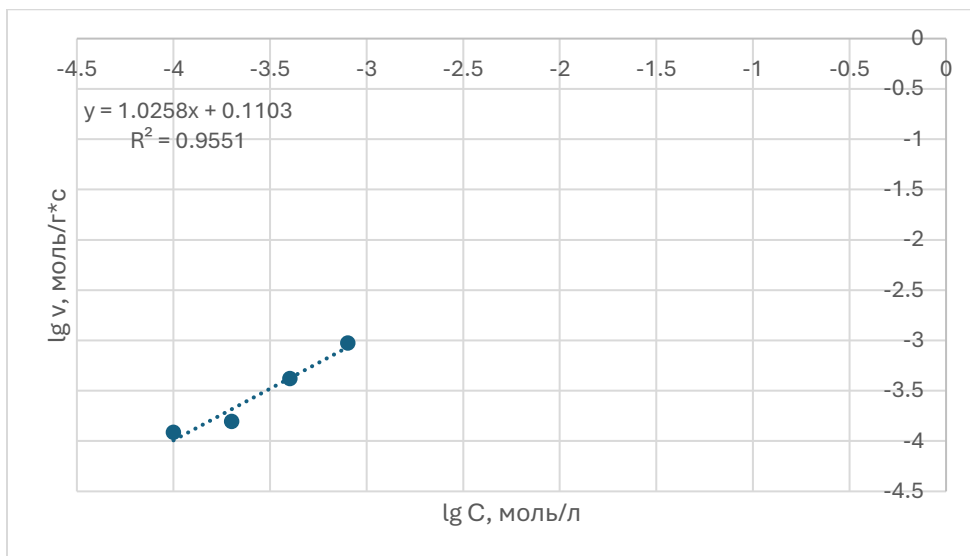


Рис. 3.20 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду гідропероксид кумену, каталізатор – GO+PVP+L-аскорбінова кислота

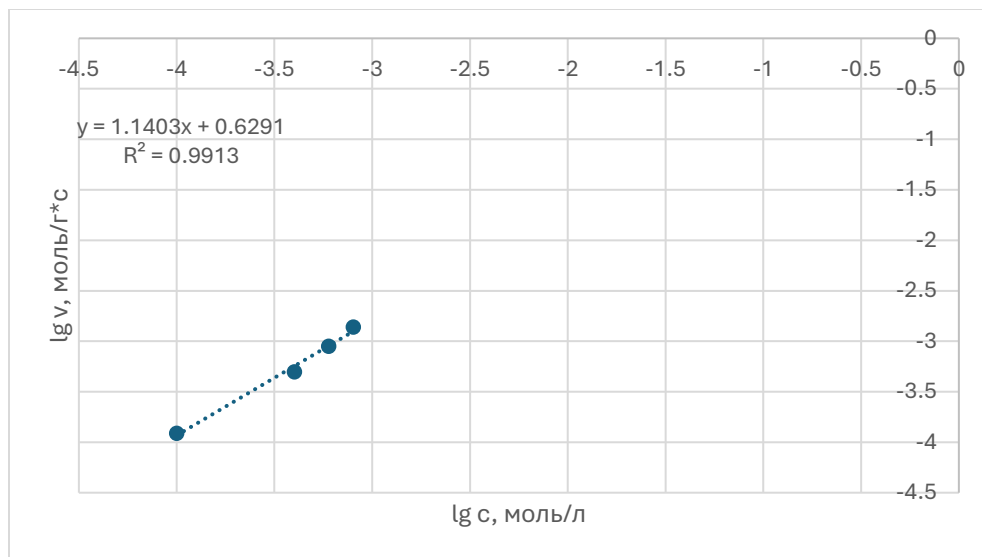


Рис. 3.21 Залежність логарифму швидкості від логарифму концентрації розпаду гідропероксид кумену, каталізатор – GO+PVP+нікотинова кислота

У таблиці наведені константи швидкості розкладання гідропероксид кумену. Найбільше значення константи швидкості 0,942 має GO+PVP, що свідчить про його високі каталітичні та антиоксидантні властивості. GO+PVP+L-аскорбінова кислота та чистий GO також мають високі значення константи швидкості 0,776 та 0,761 відповідно.

Таблиця 6 Константи швидкості розкладання гідропероксид кумену

	k, s^{-1}
GO	0,761
PVP	0,415
GO+PVP	0,942
GO+PVP+L-аскорбінова кислота	0,776
GO+PVP+нікотинова кислота	0,235

Висновки

1. Проаналізовано літературу та встановлено, що графен оксид має двовимірну шарувату структуру, збагачену кисневмісними функціональними групами, які забезпечують велику площу поверхні та реакційну здатність, що робить його чудовим матеріалом для подальшої функціоналізації. Для покращення його антиоксидантних властивостей використовують нанокompозити із біосумісними полімерними матрицями.
2. Розроблено новий метод синтезу нанокompозитів на основі GO, визначено адсорбційну ємність GO щодо полівінілпіролідону (PVP), що становить 170 мг/г, яка підтверджує успішну взаємодію та модифікацію поверхні.
3. Проаналізовано структуру отриманих нанокompозитів методами ІЧ спектроскопії, динамічного світлорозсіювання (DLS), елементного аналізу, сканувальної електронної (SEM) та атомно-силової (AFM) мікроскопій. Встановлено, що синтезовані нанокompозити зберігають двовимірну шарувату структуру та мають різні гідродинамічні розміри залежно від рН середовища.
4. Визначено антиоксиданту здатність отриманого нанокompозиту та його складових на модельних реакціях розкладання пероксиду водню та кумен гідропероксиду шляхом вимірювання константи швидкості реакції у водних та неводних середовищах і встановлено, що найкращі антиоксидантні властивості проявляє GO+PVP, адже константи швидкості становлять $4,92 \cdot 10^{-4}$ та 0,942, при розкладанні пероксиду водню та кумен гідропероксиду відповідно. Чистий GO та GO+PVP+L-аскорбінова кислота також проявляють антиоксидантні та каталітичні властивості.

5. Швидкість розкладання кумен гідропероксиду перевищує швидкість розкладання пероксиду водню на 3 порядки, що свідчить про полегшений перебіг реакції в неводних (ацетонітрил) середовищах, а синергетичний ефект (активність нанокompозиту вдвічі вище за активність вихідних компонентів) доводить доцільність модифікування поверхні графен оксиду біосумісним полімером для подальшого використання в біомедицині.

Список використаної літератури:

1. Niki, E. Oxidative Stress and Antioxidants: Distress or Eustress? *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 124, 564. Díez-Pascual, A.M.; Díez-Vicente, A.L. Antibacterial SnO₂ nanorods as efficient fillers of poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 78, 806–816.
2. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15(12), 9252–9287
3. Delplace, V., & Nicolas, J. (2015). Degradable vinyl polymers for biomedical applications. *Nature Chemistry*, 7(10), 771.
4. Gulcin I, Gören AC, Taslimi P, Akyuz B, Tüzün B (2020) Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-Analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocat Agric Biotechnol* 23:101441
5. Nilofar, Zengin G, Uba AI, Abul N, Gülçin İ, Koyuncu İ, Yüksekdağ Ö, Ponnaiya SKK, Tessappan S, Nazzaro F, Fratianni F, Coppola F, Kalyniukova A, Emre G, Andruch V (2024) A multifunctional natural treasure based on a “one stone, many birds” strategy for designing health-promoting applications: *Tordylium apulum*. *Food Biosci* 62(2024):105088
6. Zengin G, Terzić M, Abul N, Gülçin İ, Koyuncu İ, Basarali MK, Dordevic T, Cziaky Z, Jeko J (2025b) A multidimensional study for design functional foods: chemical profiling, antioxidant potential, enzyme inhibition, and cytotoxic effects of *Alkanna tubulosa* extracts. *Food Biosci* 60:104280
7. Izol E, Turhan M, Yılmaz MA, Çağlayan C, Gülçin İ (2024) Determination of antioxidant, antidiabetic, anticholinergic, antiglaucoma properties and comprehensive phytochemical content by LC-MS/ MS of Bingöl honey. *Food Sci Nutr* 1321:7488590

8. Elmastas M, Celik SM, Genc N, Aksit H, Erenler R, Gulçin İ (2018) Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea-*Origanum minutiflorum*: Isolation and characterization of its secondary metabolites. *Int J Food Proper* 21(1):374–384
9. Apak R, Calokerinos A, Gorinstein S, Segundo MA, Hibbert DB, Gülçin İ, Demirci Çekiç S, Güçlü K, Özyürek M, Esin Çelik S, Magalhaes LM, Arancibia-Avila P (2022) Methods to evaluate the scavenging activity of antioxidants toward reactive oxygen and nitrogen species. *Pure Appl Chem* 94(1):87–144
10. Gulcin I, Oktay M, Köksal E, Şerbetçi H, Beydemir Ş, Küfrevioğlu ÖI (2008a) Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. *Asian J Chem* 20:2079–2090
11. Turkan F, Atalar MN, Aras A, Gulcin I, Bursal E (2020) ICP-MS and HPLC analyses, enzyme inhibition and antioxidant potential of *Achillea schischkinii* Sosn. *Bioorg Chem* 94:103333
12. Forman, K., Martí'nez, F., Cifuentes, M., Ferna'ndez, M., Bertinat, R., Torres, P., et al. (2020). Dehydroascorbic acid, the oxidized form of vitamin C, improves renal histology and function in old mice. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9773–9784.
13. Hille, R., & Nishino, T. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal*, 9(11), 995–1003.
14. Gęgotek, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Synergistic cytoprotective effects of rutin and ascorbic acid on the proteomic profile of 3D-cultured keratinocytes exposed to UVA or UVB radiation. *Nutrients*, 11(11), 2672.

15. Bhardwaj JK, Panchal H, Saraf P (2021) Ameliorating effects of natural antioxidant compounds on female infertility: a review. *Reprod Sci* 28(5):1227–1256.
16. Duarte TL, Lunec J (2005) Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of a novel act
17. Gülçin I (2020) Antioxidants and antioxidant methods-An updated overview. *Arch Toxicol* 94(3):651–715
18. Díez-Pascual, A.M. Antibacterial activity of nanomaterials. *Nanomaterials* 2018, 8, 359.
19. Díez-Pascual, A.M.; Luceño Sánchez, J.A.; Peña Capilla, R.; García Díaz, P. Recent developments in graphene/polymer nanocomposites for application in polymer solar cells. *Polymers* 2018, 10, 217.
20. Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W.; Ruoff, R.S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 39, 228–240.
21. Hancock, J.T.; Desikan, R.; Neill, S.J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 2001, 29, 345–349. [CrossRef]
22. Pei, S.; Cheng, H. The reduction of graphene oxide. *Carbon* 2012, 50, 3210–3228.
23. Sydlik, S.A.; Jhunjhunwala, S.; Webber, M.J.; Anderson, D.G.; Langer, R. In Vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano* 2015, 9, 3866–3874.
24. Mahmoudi, N.; Ostadhossein, F.; Simchi, A. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan-polyvinylpyrrolidone films containing self-organized graphene oxide nanolayers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2016, 133
25. H. Bai, W. T. Jiang, G. P. Kotchey, W. A. Saidi, B. J. Bythell, J. M. Jarvis, A. G. Marshall, R. A. S. Robinson and A. Star, Insight into the Mechanism

- of Graphene Oxide Degradation via the Photo-Fenton Reaction, *J. Phys. Chem. C*, 2014, 118, 10519–10529.
26. Y. Gao, X. Ren, X. Zhang and C. Chen, Environmental fate and risk of ultraviolet- and visible-light-transformed graphene oxide: A comparative study, *Environ. Pollut.*, 2019, 251, 821–829.
27. W.-C. Hou, W. M. Henderson, I. Chowdhury, D. G. Goodwin, X. Chang, S. Martin, D. H. Fairbrother, D. Bouchard and R. G. Zepp, The contribution of indirect photolysis to the degradation of graphene oxide in sunlight, *Carbon*, 2016, 110, 426–437.
28. F. F. Zhao, S. C. Wang, Z. L. Zhu, S. G. Wang, F. F. Liu and G. Z. Liu, Effects of oxidation degree on photo-transformation and the resulting toxicity of graphene oxide in aqueous environment, *Environ. Pollut.*, 2019, 249, 1106–1114.
29. X. G. Hu, M. Zhou and Q. X. Zhou, Ambient Water and Visible-Light Irradiation Drive Changes in Graphene Morphology, Structure, Surface Chemistry, Aggregation, and Toxicity, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, 49, 3410–3418
30. H. Zhao, C. Zhang, Y. Wang, W. Chen and P. J. J. Alvarez, Self-Damaging Aerobic Reduction of Graphene Oxide by *Escherichia coli*: Role of GO-Mediated Extracellular Superoxide Formation, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, 52, 12783–12791.
31. Kateryna V. Sencha-Hlevatska, Yury I. Sementsov, Sergey V. Zhuravskiy, Lidia A. Mys, Yulia P. Korkach, Hristo Kolev, Vadym F. Sagach and Yulia V. Goshovska (2024). A multifactorial study of in situ antioxidant activity of modified GrO in myocardial reperfusion injury using the Langerdorff model 753(14):109885

32. Farjadian, F., Abbaspour, S., Sadatlu, M. A. A., Mirkiani, S., Ghasemi, A., Hoseini-Ghahfarokhi, M., Mozafari, N., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2020). Recent developments in graphene and graphene oxide: Properties, synthesis, and modifications: A review. *Chemistry Select*, 5(33), 10200–10219.
33. Rajaei, M., Rashedi, H., Yazdian, F., Navaei-Nigjeh, M., Rahdar, A., & Díez-Pascual, A. M. (2023). Chitosan/agarose/graphene oxide nanohydrogel as drug delivery system of 5-fluorouracil in breast cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 82, 104307
34. Fedotov, A., Prischepa, S., Fedotova, J., Bayev, V., Ronassi, A. A., Komissarov, I., Kovalchuk, N., Vorobyova, S., & Ivashkevich, O. (2020). Electrical conductivity and magnetoresistance in twisted graphene electrochemically decorated with Co particles. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 117, 113790.
35. Anirudhan, T., Sekhar, V. C., & Athira, V. (2020). Graphene oxide based functionalized chitosan polyelectrolyte nanocomposite for targeted and pH responsive drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 468–479.
36. Trusek, A., Kijak, E., & Granicka, L. (2020). Graphene oxide as a potential drug carrier—Chemical carrier activation, drug attachment and its enzymatic controlled release. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111240.
37. Cheng, S.-J., Chiu, H.-Y., Kumar, P. V., Hsieh, K. Y., Yang, J.-W., Lin, Y.-R., Shen, Y.-C., & Chen, G.-Y. (2018). Simultaneous drug delivery and cellular imaging using graphene oxide. *Biomaterials Science*, 6(4), 813–819.
38. Singh, N., Kushwaha, P., Gupta, A., & Prakash, O. (2020). Recent advances of novel therapeutic agents from botanicals for prevention and therapy of

- breast cancer: An updated review. *Current Cancer Therapy Reviews*, 16(1), 5–18.
39. Liu, X., Cheng, X., Wang, F., Feng, L., Wang, Y., Zheng, Y., & Guo, R. (2018). Targeted delivery of SNX-2112 by polysaccharide-modified graphene oxide nanocomposites for treatment of lung cancer. *Carbohydrate Polymers*, 185, 85–95.
40. Verma, D., & Sharma, S. K. (2021). Recent advances in guar gum based drug delivery systems and their administrative routes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 653–671.
41. Yang, H., Bremner, D. H., Tao, L., Li, H., Hu, J., & Zhu, L. (2016). Carboxymethyl chitosan-mediated synthesis of hyaluronic acid-targeted graphene oxide for cancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 135, 72–78.
42. Javanbakht, S., Pooresmaeil, M., & Namazi, H. (2019). Green one-pot synthesis of carboxymethylcellulose/Zn-based metalorganic framework/graphene oxide bio-nanocomposite as a nanocarrier for drug delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 208, 294–301.
43. X. Zhang, J. Wang, H. Jia, et al., “Polyvinyl Pyrrolidone Modified Graphene Oxide for Improving the Mechanical, Thermal Conductivity and Solvent Resistance Properties of Natural Rubber,” *Royal Society of Chemistry Advances* 6, no. 60 (2016): 54668–54678
44. S. Chen, B. Cheng, and C. Ding, “Synthesis and Characterization of Poly(Vinyl Pyrrolidone)/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite,” *Journal of Macromolecular Science, Part B* 54, no. 4 (2015): 481–491